

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problems Mailbox.**

PCT

世界知的所有権機関

国際事務局

E 3244-01



特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(51) 国際特許分類 5 C12N 7/01, 15/31, 15/62, C12P 21/02, C07K 7/10, A61K 39/02 // (C12P 21/02, C12R 1:92)	A1	(11) 国際公開番号 WO 94/23019
(21) 国際出願番号 PCT/JP94/00541		(43) 国際公開日 1994年10月13日(13.10.94)
(22) 国際出願日 1994年3月31日(31. 03. 94)		
(30) 優先権データ 特願平5/74139 1993年3月31日(31. 03. 93) JP 特願平5/245625 1993年9月30日(30. 09. 93) JP		入谷好一 (IRITANI, Yoshikazu) [JP/JP] 〒612 京都府京都市伏見区深草大龜谷万帖敷町151番地 Kyoto, (JP)
(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 日本ゼオン株式会社 (NIPPON ZEON CO., LTD.) [JP/JP] 〒100 東京都千代田区丸の内二丁目6番1号 Tokyo, (JP) 塩野義製薬株式会社 (SHIONOGI & CO., LTD.) [JP/JP] 〒541 大阪府大阪市中央区道修町三丁目1番8号 Osaka, (JP)		舟山茂美 (AOYAMA, Shigemi) [JP/JP] 〒528 滋賀県甲賀郡水口町賀生川370-13 Shiga, (JP) 高橋清人 (TAKAHASHI, Kiyohito) [JP/JP] 〒520-30 滋賀県栗太郡栗東町小平井71-21 Shiga, (JP)
(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 斎藤修治 (SAITO, Shuji) [JP/JP] 〒235 神奈川県横浜市磯子区洋光台3-35-8 Kanagawa, (JP) 大川筋子 (OHKAWA, Setsuko) [JP/JP] 〒222 神奈川県横浜市港北区篠原西町17-13-203 Kanagawa, (JP) 佐伯早木子 (SAEKI, Sakiko) [JP/JP] 〒146 東京都大田区東矢口1-16-8 Tokyo, (JP) 大澤郁朗 (OHSAWA, Ikuroh) [JP/JP] 〒161 東京都新宿区中落合3-11-11 Tokyo, (JP) 船戸洋乃 (FUNATO, Hiroko) [JP/JP] 〒340 埼玉県草加市吉町3-3-7 Saitama, (JP)		(74) 代理人 弁理士 梶村 皓, 外 (ASAMURA, Kiyoshi et al.) 〒100 東京都千代田区大手町2丁目2番1号 新大手町ビル331 Tokyo, (JP)
		(81) 指定国 AU, CA, JP, KR, US, 欧州特許 (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
		添付公開書類
		国際調査報告書

(54) Title : NOVEL POLYPEPTIDE, DNA CODING FOR SAID POLYPEPTIDE, RECOMBINANT VECTOR CONTAINING SAID DNA, RECOMBINANT VIRUS PREPARED USING SAID VECTOR, AND USE THEREOF

(54) 発明の名称 新規なポリペプチド、同ポリペプチドをコードするDNA、同DNAを含む組み換えベクター、同組み換えベクターを利用した組み換えウイルス、およびその利用

(57) Abstract

A polypeptide exhibiting the antigenicity of *Mycoplasma gallisepticum*, a fused polypeptide comprising the above polypeptide and, connected to the N-terminus thereof, a signal membrane anchor of a type II outer-membrane polypeptide of a virus that infects birds, or a polypeptide capable of reacting with a mycoplasma-immune serum or a mycoplasma-infected serum and exhibiting a substantially pure antigenicity, respectively having amino acid sequences of about 32 kDa, about 40 kDa, or about 70kDa. The expression with a recombinant virus of a polypeptide modified to such an extent as to exhibit an antigenicity equivalent to that of any of the above polypeptides. The use of a recombinant virus as a live vaccine.

(57) 要約

マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチド、同ポリペプチドのN末端側に、鳥類に感染するウイルスのタイプII外膜ポリペプチドのシグナル膜アンカーが連結している融合ポリペプチド、又はマイコプラズマ免疫血清またはマイコプラズマ感染血清に反応しうる実質的に純粹な抗原性を示すポリペプチドで約32キロダルトン、約40キロダルトン、約70キロダルトンのアミノ酸配列を有するものなど、あるいは同ポリペプチドと同等の免疫原性を示す程度に修飾されたものの組み換えウイルスを用いて発現させること、および組み換えウイルスの生ワクチンとしての利用。

情報としての用途のみ

PCTに基づいて公開される国際出願のパンフレット第1頁にPCT加盟国を同定するために使用されるコード

AM アルメニア	CZ チェコ共和国	KP 朝鮮民主主義人民共和国	NZ ニュージーランド
AT オーストリア	DE ドイツ	KR 大韓民国	PL ポーランド
AU オーストラリア	DK デンマーク	KZ カザフスタン	PT ポルトガル
BB バルバドス	EE エストニア	LI リヒテンシュタイン	RO ルーマニア
BE ベルギー	ES スペイン	LK スリランカ	RU ロシア連邦
BF ブルキナ・ファソ	FI フィンランド	LT リトアニア	SD スーダン
BG ブルガリア	FR フランス	LU ルクセンブルグ	SE スウェーデン
BJ ベナン	GA ガボン	LV ラトヴィア	SI スロヴェニア
BR ブラジル	GB イギリス	MC モナコ	SK スロバキア共和国
BY ベラルーシ	GE グルジア	MD モルドバ	SN セネガル
CA カナダ	GN ギニア	MG マダガスカル	TD チャード
CF 中央アフリカ共和国	GR ギリシャ	ML マリ	TG トーゴ
CG コンゴー	HU ハンガリー	MN モンゴル	TJ タジキスタン
CH スイス	IE アイルランド	MR モーリタニア	TT トリニダード・トバゴ
CI コート・ジボアール	IT イタリー	MW マラウイ	UA ウクライナ
CM カメルーン	JP 日本	NE ニジェール	US 米国
CN 中国	KE ケニア	NL オランダ	UZ ウズベキスタン共和国
CS ナエコスロバキア	KG キルギスタン	NO ノルウェー	VN ヴィエトナム

明細書

新規なポリペプチド、同ポリペプチドをコードするDNA、同DNAを含む組み換えベクター、同組み換えベクターを利用した組み換えウイルス、およびその利用

技術分野

本発明は、新規なマイコプラズマ・ガリセプティカムに対して抗原性を示すポリペプチド、同ポリペプチドとシグナル膜アンカーとの融合ポリペプチド、およびマイコプラズマ・ガリセプティカムに対して抗原性を示すポリペプチド、特に宿主細胞膜表面に抗原性を示すポリペプチドを発現することのできる組み換えアビポックスウイルス、並びにその利用に関する。

背景技術

鶏の産卵率や孵化率の低下の原因のひとつにもなっているマイコプラズマ・ガリセプティカム (Mycoplasmal gallisepticum) に対して抗原性を示すポリペプチドは、抗マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症ワクチンの有効成分として利用できると期待されている。現在のところマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質の遺伝子工学的な製造は、大腸菌や酵母を用いた系（特開平2-111795号公報など）が知られているが、一般に、菌を用いる系

でのポリペプチドの製造には、第1に抗原発現量が少ない、第2に宿主由来の発熱性物質が取り除けないなどの問題が指摘されており、いまだ実用に供されていないのが現状である。このため、組み換えウイルスを用いた抗原性を示すポリペプチドの製造や組み換え生ワクチンの研究が進められている。しかし、マイコプラズマ・ガリセプティカムに関しては、該タンパク質をコードするDNAを組み込んだ組み換えウイルスが作製されていない。

ところで、ウイルスのタンパク質には、ウイルスが細胞に感染したとき、発現したタンパク質が細胞表面に輸送され、輸送されたタンパク質が細胞膜表面に呈示される（以下、これら一連の状態を単に細胞表面に呈示するという表現を使うことがある）タンパク質と呈示されないタンパク質とがある。前者の代表的な例としては、ウイルスの外膜に含まれる糖タンパク質がある。この様なタンパク質を発現する組み換えウイルスは、細胞表面に該タンパク質を効率よく呈示することから、この組み換えウイルスを感染させた鶏で高度の抗体価を誘導することが可能となると考えられている（特開平1-157381号公報）。一方、後者の例としては、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原タンパク質などのようなバクテリア由来のタンパク質がある。

このようなタンパク質を発現する組み換えウイルスは、細胞膜表面に呈示されるタンパク質量がきわめてわずか

だったり、タンパク質が細胞表面に全く呈示されないために、高い抗体価を誘導することは期待できない。しかし、このようなタンパク質を、遺伝子工学的に細胞膜表面に多量に呈示させることができれば高い抗体価を誘導することができると期待される。そこで本来、膜表面に呈示しないタンパク質を膜表面に呈示させるための研究がなされており、例えば、タンパク質を細胞膜表面に分泌させる機能を有するシグナルタンパク質をコードするDNAと分泌したタンパク質を細胞膜表面から離れないように保持する機能を有する膜アンカータンパク質をコードするDNAとを、それぞれ抗原タンパク質をコードするDNAの5'側と3'側に連結させたハイブリッドDNAを組み込んだ組み換えワクチニアウイルスが宿主細胞膜表面に抗原タンパク質を呈示させたという報告がなされている (J. Virol. 64, 4776-4783 (1990) や Mol. Cell. Biol. 6, 3191-3199 (1986))。しかし、これらの例では、シグナルをコードするDNAと膜アンカーをコードするDNAとを別々に抗原タンパク質をコードするDNAに連結させてるため、組み換えウイルスの作製が繁雑となり、実用に適しているとはいひ難いものであった。

発明の開示

本発明者らは、かかる従来技術の下で、高い抗原性を

示すマイコプラズマ由来の抗原性を示すポリペプチド、特に多量に細胞膜表面に呈示されるマイコプラズマ・ガリセプティカムに対して抗原性を示すポリペプチド、同ポリペプチドをコードするDNA、同DNAを組み込んだ組み換えウイルス、同ウイルスを利用したワクチンを提供せんとして種々検討の結果、本発明を完成するに到了。

図面の簡単な説明

第1図は、TM-81のオープンリーディングフレームを含むDNA制限酵素切断点地図を、

第2図は、TTM-1NおよびTTM-1Cの構成方法を、

第3図は、pNZ7929-R1の構築方法を、

第4図は、pNZ87Nの構築方法を、

第5図は、pNZ7929-R2の構築方法を、

第6図(A)及び第6図(B)は、

pNZ2929XM1の構築方法を、

第7図はTTM-1ポリペプチドのオープンリーディングフレームを含むDNAの制限酵素切断地点地図を、

第8図はTM-67ポリペプチドのオープンリーディングフレームを含むDNAの制限酵素切断地点地図と合成プライマーのORF上の位置を、

第9図(A)および第9図(B)はpNZ7929-67の構築方法を、

第10図はTM-66ポリペプチドのオープンリーディングフレームを含むDNAの制限酵素切断地点地図と合成プライマーのORF上の位置を、

第11図(A)、第11図(B)および第11図(C)はpTM66の構築方法を、

第12図はpNZ7929-66の構築方法を、

第13図はTM-16ポリペプチド全長をコードするDNAの制限酵素切断点地図を、

第14図はTM-16ポリペプチドのオープンリーディングフレームの制限酵素切断点地図を示す。

発明を実施するための最良の形態

本発明の第1の側面である新規な高い抗原性を持つマイコプラズマ由来の抗原性を示すポリペプチドとしては、マイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清と抗原抗体反応を呈し、マイコプラズマ・ガリセプティカムに由来する第7図の制限酵素切断点地図を有するDNA配列がコードする抗原性を示すポリペプチド、またはその修飾されたものが第1に挙げられる。このような抗原性を示すポリペプチドの具体例として、配列番号1, 15, 16および27に示されるアミノ酸配列をもつ抗原性を示すポリペプチドが例示される。また、ここでいう修飾された抗原性を示すポリペプチドとは、上述のポリペプチドと同等の免疫原性を示す程度にアミノ酸配列が置換・脱落

・欠損・挿入、付加されたものをいい、例えば、配列番号1を例にとると、同配列のアミノ酸のアミノ酸配列を有する抗原タンパク質と同等の免疫原性を有し、かつ該ポリペプチドのアミノ酸配列との相同性が70%以上、より好ましくは80%以上、更に好ましくは90%以上のものを指称する。本発明でいう相同性は、DNAシーケンス入力解析システム「DNASIS」（発売元：宝酒造（株））により測定されたものを指標とするものである。

尚、以下本明細書において、配列番号を配列と略称することもある。例えば、配列番号1を配列1と称することもある。

更に本発明で使用される抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAとしては、マイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清と抗原抗体反応を呈し、マイコプラズマ・ガリセプティカムに由来する抗原性を示すポリペプチド、または同等の抗原性を示す限りにおいて、アミノ酸が欠損・付加・挿入・脱落・置換などの修飾を受けているポリペプチドをコードしているものが挙げられる。

また、本発明の第2の側面である組み換えアビポックスウイルスは、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性ポリペプチドをコードするDNA（以下、抗原DNAという）または、タイプII外膜タンパク質のシグナル膜アンカーをコードするDNAにマイコプラズマ

・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAを連結させたハイブリッドDNAを組み込んだ組み換えアビポックスウイルスであり、本来は細胞膜表面に呈示されないマイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドを多量に細胞膜表面に呈示させるためにはハイブリッドDNAを用いるのが好ましい。

即ち、本発明の第2の側面においては、マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチド（以下、単に抗原タンパク質ということもある）、該ポリペプチドのN末端側に、鳥類に感染するウイルスのタイプII外膜タンパク質のシグナル膜アンカー（以下、単にシグナル膜アンカーという）を連結させた融合ポリペプチド、該抗原タンパク質または該融合ポリペプチドを有効成分とする抗マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症ワクチン、該融合ポリペプチドをコードするハイブリッドDNA、該抗原タンパク質をコードするDNAまたは該ハイブリッドDNAをアビポックスウイルスの増殖に非必須なゲノム領域（以下、非必須領域という）に組み込んだ組み換えアビポックスウイルス、該アビポックスウイルスを有効成分とする抗マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症生ワクチンが提供される。

本発明で第2の側面に係る発明に使用されるというシグナル膜アンカーとは、鳥類に感染するウイルスのタイプII外膜タンパク質を細胞膜表面に輸送し、輸送され

た該タンパク質を細胞膜表面に呈示する機能を有するポリペプチド領域であり、好ましくはヒトへの病原性を示さないウイルス由来のものである。本発明で使用されるシグナル膜アンカーをコードするDNA（以下、シグナル膜アンカーDNAという）は、タイプII外膜タンパク質のアミノ末端側の疎水性ペプチド領域をアミノ酸配列により解析することにより、容易に見いだすことが可能である。シグナル膜アンカーの具体例としては、配列番号13に示す配列からなるもの（Mo1. Cei1. Biol. 10、449-457（1990））が挙げられる。このDNAは、ニューカッスル病ウイルス（以下、NDVという）のヘマグルチニン・ノイラミニダーゼ（以下、HNタンパク質という）のアミノ末端側の22アミノ酸をコードするものである。

また、発現した抗原タンパク質の細胞膜への呈示を安定させるためには、シグナル膜アンカーのカルボキシ末端側に親水性のペプチドが存在することが有効であるため、シグナル膜アンカーDNAの下流に親水性ペプチドをコードするDNAが付加していることが好ましい。付加するDNAは、10～50アミノ酸好ましくは20～30アミノ酸分の塩基対である。

本発明に係る抗原タンパク質をコードするDNAの具体例として、第1の側面である4つの配列の他、特開平1-111795号公報に記載されたDNAやそのDNAを含むマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノ

ムDNA断片、配列番号14に示される配列からなる約40キロダルトンの抗原性を示すポリペプチド（以下、TTM-1'ポリペプチドという）をコードするDNA（以下、TTM-1'いう）や、TTM-1'と実質的に同等の天然のマイコプラズマ・ガリセプティカム由来のDNA（以下、TTM-1という）などが例示される。このTTM-1及び1'はWO 93/24646にて開示されたものである。また、該塩基配列によってコードされる抗原タンパク質と実質的に同等の抗原性を示すかぎりにおいて配列の一部が置換・脱落・欠損・挿入・付加等によって修飾されたポリペプチドをコードするDNAであってもよい。

このようなDNAの採取源としては、マイコプラズマ・ガリセプティカムに属するものであればよく、その具体例としてS6株(ATCC15302)、PG31株(ATCC19610)などが例示される。

本発明の第2の側面において使用されるハイブリッドDNAは、上記シグナル膜アンカーDNAと抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAとが連結されたものであり、本発明の融合ポリペプチドは、前記ハイブリッドDNAによりコードされるポリペプチドであって、ポリペプチド分子内にシグナル膜アンカー部分と抗原性を示すポリペプチド部分とを含むポリペプチドである。ハイブリッドDNAは、常法、例えばシグナル膜アンカーDNAの3'末端と抗原タンパク質をコードするDNA

の 5' 末端とが結合可能な制限酵素切断断片となるよう
にし、両者をリガーゼで連結する方法や適当なリンカー
を挟んで両DNAをリガーゼで連結する方法などにより
作製される。また、シグナル膜アンカーと抗原性を示す
ポリペプチドとがひとつのポリペプチドとして発現する
限りにおいてシグナル膜アンカーDNAと抗原性を示す
ポリペプチドをコードするDNAとの間に、例えば、親
水性ペプチドをコードするDNA、他の抗原タンパク質
をコードするDNA、リンカーDNAなどが含まれたも
のであっても良い。本発明の融合ポリペプチドは、後述
する組み換えアビポックスウイルスを鶏胎児纖維芽細胞
(以下、CEF細胞という) や発育鶏卵しょう尿膜細胞
などの培養細胞にて培養し、クロマトグラフィー、塩析
による沈殿、密度勾配遠心等から任意に選択した方法に
より、目的とする抗原性を示すポリペプチドが精製され
る。こうして得られた融合ポリペプチドは、後述するよ
うにコンポーネントワクチンとして用いることができる。

本発明の組み換えアビポックスウイルスは、アビポッ
クスウイルスの非必須領域に上述のDNA又はハイブリ
ッドDNAを組み込んだ組み換えアビポックスウイルス
である。本発明の組み換えアビポックスウイルスの構築
方法は、常法、例えば特開平1-168279号公報に
記載の方法に従えばよい。即ち、まず、アビポックスウ
イルスの非必須領域を必要に応じて同非必須領域にプロ
モーターを挿入したDNA断片を組み込んだ第一の組み

換えベクターが構築される。

本発明で用いるアビポックスウイルスの非必須領域としては、クエイルポックスウイルスのTK遺伝子領域、七面鳥ポックスウイルスのTK遺伝子領域や特開平1-168279号公報に記載されたDNA断片が挙げられ、好ましくは、前記公報記載の約7.3KbpのEcoRI断片、約5.2KbpのHindIII断片、約5.0KbpのEcoRI-HindIII断片、約4.0KbpのBamHI断片と相同組み換えを起こす領域である。

本発明で用いるベクターとしては、例えばpBR322、pBR325、pBR327、pBR328、pUC7、pUC8、pUC9、pUC19などのプラスミド、λファージ、M13ファージなどのファージ、pHCT9(Gene, 11, 第291頁, 1980年)などのコスミドが例示される。

本発明で用いられるアビポックスウイルスは、鳥類に感染するウイルスであれば特に限定されない。このようなウイルスの具体例としては、ピジョンポックスウイルス、フォウルポックスウイルス(以下、FPVという)、カナリーポックスウイルス、七面鳥ポックスウイルスなどが例示されるが、好ましくは七面鳥ポックスウイルス、ピジョンポックスウイルス、FPVであり、より好ましくはピジョンポックスウイルス、FPVである。とりわけ好ましいアビポックスウイルスの具体例としては、

ATCC VR-251、ATCC VR-249、
ATCC VR-250、ATCC VR-229、
ATCC VR-288、西ヶ原株、泗水株、CEVA
株、CEVA株由来のウイルスのうち鶏胚纖維芽細胞に
感染したときに大きいプラークを形成するウイルス株な
どのこときFPVや、NP株（鶏胎化鳩痘毒中野系株）
などのように鶏痘生ワクチン株として使用されるFPV
と近縁のウイルスなどが例示される。これらの株はいず
れも市販されているなど、容易に入手することができる。

ついで、前記第一の組み換えベクターの非必須領域内
に上述の抗原DNA、またはハイブリッドDNAを組み
込んだ第二の組み換えベクターを構築する。通常、ハイ
ブリッドDNAを用いる場合には、その上流にプロモー
ターを組み込む。使用されるプロモーターは、合成・天
然を問わずAPVが保有する転写の系でプロモーターと
して有効に機能しうるものなら如何なる塩基配列のもの
でも良く、チミジンキナーゼをコードする

APV遺伝子のプロモーターなどAPV固有のプロモー
ターはもちろんのこと、APV以外のウイルス由来の
DNAや真核生物もしくは原核生物由来のDNAであっ
ても上記条件を満たす限り当然本発明に使用可能である。
このようなプロモーターの具体例としては、例えば
J. Virol., 51, 第662~669頁(198
4年)に例示されるようなワクチニアウイルス(以下、
VVと称すこともある)のプロモーター、具体的には7.

5 K ポリペプチドをコードする VV DNA のプロモーター、 19 K ポリペプチドをコードする VV DNA のプロモーター、 42 K ポリペプチドをコードする VV DNA のプロモーター、 チミジンキナーゼをコードする VV DNA のプロモーター、 28 K ポリペプチドをコードする VV DNA のプロモーターなどが例示される。また、 Moss らの文献 (J. Mol. Biol., 210, 第 749~776 頁, 第 771~784 頁, 1989 年) を参考にした合成プロモーター、 Davidson の合成プロモーターやその一部をプロモーター活性が喪失しない範囲での削除、変更などにより改変されたもの (たとえば、 TTTTTTTTTT TGGCATATAAAATAATAAAATACATAAATTAAATTACGGCGTAAAAAATTGA AAAACTATTCTAATTATTGCACTC や TTTTTTTTTTTTTTTTTGGCATATAAAATAAAATACAAATAATTAA TTACGGCGTAAAAAATTGAAAAACTATCTAATTATTGCACTC など) を用いることもできる。

また、組み換えウイルスの検出が容易であるという点から β -ガラクトシダーゼをコードする DNA などのマークー DNA も組み込むことができる。

組み換えアビポックスウイルスの作製は、予めアビポックスウイルスを感染させた動物培養細胞に上記の第二

の組み換えベクターを移入し、ベクターDNAとウイルスゲノムDNAとの間で相同組み換えをおこさせればよい。ここで用いられる動物培養細胞は、アビポックスウイルスが増殖可能なものであれば良く、その具体例としてはCEF細胞や発育鶏卵しょう尿膜細胞などが例示される。

宿主細胞に感染しているウイルスからplaques hybridizationやelutionなどにより目的とする組み換えアビポックスウイルスを単離し、更にplaques assayなどにより純化することができる。

上記の方法により構築された本発明の組み換えウイルスは抗マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症生ワクチンとして鳥類に接種することができる。

本発明の生ワクチンの調製方法は特に限定されないが、例えば次の方法によって調製される。本発明の組み換えウイルスを該ウイルスが生育することができる細胞（以下、宿主細胞という）に感染させ、増殖させたのち、細胞を回収し破碎する。この細胞破碎物を遠心分離機によって遠心分離チューブ中で沈澱物と組み換えウイルスを含有する高力価上清とに分離する。得られた上清は、実質的に宿主細胞を含まず、細胞培養培地と組み換えウイルスを含んでおり、生ワクチンとして使用することができる。この上清には薬理学的に問題のないキャリアー、例えば生理食塩水などを添加し、希釈することもできる。また、この上清は凍結乾燥しても生ワクチンとして使用

できる。本発明の生ワクチンの家禽への投与方法は特に限定されず、例えば皮膚に引っかき傷をつけて生ワクチンを接種する方法、注射により接種する方法、飼料や飲み水に混合して経口投与する、エアロゾルやスプレーなどにより吸入させる方法などが挙げられる。生ワクチンとして使用するには、通常の生ワクチンの使用と同様でよく、例えば、ニワトリ 1 羽当たり $10^2 \sim 10^8$ プラク・フォーミング・ユニット（以下、P F U という）程度を接種する。注射により接種する場合、通常 0.1 ml 程度の生理食塩水などの等張溶媒に本発明の組み換えウイルスを懸濁して用いることができる。本発明の生ワクチンは、普通の条件下で保存、使用することが可能である。例えば、本発明の組み換えウイルスを凍結乾燥すれば、室温（20～22°C）での保存が可能である。また、ウイルスの懸濁液を -20～-70°C 下で凍結させ、保存することも可能である。

一方、本発明のコンポネントワクチンは、本発明に係る抗原性を示すポリペプチド、特に融合ポリペプチドを有効成分とするものであり、家禽への投与方法は前記生ワクチンと同様である。投与量は、通常、1 羽当たり 1 μ g～1 mg 程度である。

かくして本発明によれば、マイコプラズマ・ガリセプティカム抗原性を示すポリペプチド、同ポリペプチドとシグナル膜アンカーとの融合ポリペプチドが得られ、特に、この融合ポリペプチドは抗マイコプラズマ・ガリセ

プティカム感染症ワクチンとして有用である。また、該融合タンパク質をコードするDNAを利用することにより、マイコプラズマ・ガリセプティカム抗原性を示すポリペプチドを宿主細胞膜表面に呈示することができる組み換えアビポックスウイルスが得られ、該組み換えアビポックスウイルスは、強力な抗マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症生ワクチンとして有用である。さらに、本発明の新規な抗原性を示すポリペプチドおよびそれをコードするDNAはそれぞれコンポーネントワクチン、生ワクチンとして利用できる。

実 施 例

以下本発明を実施例および参考例により説明するが、本発明は勿論これらにより限定されるものではない。

参考例 1

マイコプラズマ・ガリセプティカムが発現しているポリペプチドDNA TTM-1の取得

(1) マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノムDNAの調製

マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株を100mLのPPLOプロス基礎培地に20%馬血清、5%酵母エキス、1%グルコース、およびpH指示薬としてフェノールレッドを微量加えて調製した液体培地で、37°C 3~5日培養した。マイコプラズマ・ガリセプティカムの増殖に従って培養液のpHが下がり、培養液に含ま

れている pH 指示薬の呈色が赤から黄に変化した時点で、培養を終了し、培養液を 8000 G、20 分間遠心し、集菌した。さらに菌体を培養液の 1/10 容量の PBS に懸濁し、再び 10,000 r p m × G、20 分間遠心し、集菌した。収集菌体を再び 2.7 ml の PBS に懸濁し、更に、SDS の最終濃度が 1% となる様に SDS を、さらに 10 μg の RNase を加え、37°C 30 分間インキュベートし溶菌した。

溶菌液を等容量のフェノールで 3 回抽出しさらに、エチルエーテルで 3 回抽出を行なった後エタノール沈澱し、マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム DNA 200 μg を得た。

(2) TM-1 DNA をプローブにしたマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノミックサザンハイブリダイゼーション

上記 (1) で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカム DNA 1 μg を Xba I で消化し、0.6% 低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液 (0.5 M NaOH、1.5 M NaCl) に 10 分間浸し DNA を変性させ、中和液 (3 M 酢酸ナトリウム pH 5.5) に 10 分間浸して中和の後 6 倍 SSC 液 (0.7 M NaCl、0.07 M クエン酸ナトリウム、pH 7.5) 中でナイロンメンブレンに転写した。風乾の後 80°C で 2 時間焼き付け、4 倍 SET (0.6 M NaCl、0.08 M Tris-HCl)、

4 mM EDTA、pH 7.8) - 10倍
 Denhardt - 0.1% SDS - 0.1%
 Na₄P₂O₇ - 50 μg/m1 変性サケ精子DNAと
 pUM-1 (特開平2-111795号参照)を常法に
 従い標識したものを加えて、68°C 14時間ハイブリダ
 イゼーションをした。ナイロンメンブレンとX線フィル
 ムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、
 約3.4 kbpの断片にハイブリダイズしていることを
 確認した。

(3) Xba I消化約3.4 kbp断片のpUC-19へのクローニング及びコロニーハイブリダイゼーション

上記(1)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカム
 DNA 4 μgを制限酵素Xba Iで消化後、0.6%低
 融点アガロースゲル電気泳動後、約3.4 kbpの断片
 を回収した。この断片を、Xba I消化によって開裂し
 たpUC-19とリガーゼによって連結し、この連結し
 て得た断片を用いてコンピテントな大腸菌TG1株を形
 質転換し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-
 β-D-ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピ
 ルチオ-β-D-ガラクトピラノシド0.03mM、お
 よび40 μg/m1アンピシリンを含むLB寒天培地で
 37°C、15時間培養した。この培地上に生育した白コ
 ロニーをナイロンメンブレンに転写し、上記(2)と同様の
 方法でハイブリダイゼーションを行ない、オートラジオ

グラフィーで確認したところ、クローニングされていることが判明し、このプラスミドをPUTTM1と名付けた。

(4) TTM-1がコードするタンパクTTMG1を、TGAが翻訳終結コドンとして読まれないように改変 (TGA → TGG) したTTM-1'の作製 (第2図参照)

上記(3)で取得したPUTTM-1を制限酵素SacIとEcoRIで消化後0.8%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、TTM-1の5'端を含む1.1kbpの断片をフェノールークロロホルム処理後エタノール沈澱により回収し、回収した断片をM13mp11ファージをSacIとEcoRIで開裂させた断片とリガーゼにより連結した。この反応溶液と、37°Cで24時間培養した大腸菌TG1株に最終的に100mMとなるよう IPTGを加えてX-galが2%となるようにさらに加えた溶液とm.o.i.が0.1になるよう混合し軟寒天上に撒いて固化させ、37°C、24時間インキュベートした。出現したファージplaquesのうち青変していないファージからTTM-1の1.1kbpDNAを含む組み換えファージTTM-1Nを得た。

同様に、PUTTM-1をEcoRIとEcoRVで消化後、0.8%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、TTM-1の3'末端側を含む0.4kbpの断片をゲルより回収し、フェノール・クロロホルム処理後エタノ

ール沈澱により回収し、この断片にM 1 3 m p 1 0 ファージをE c o R I とE c o R Vで開裂させた断片とリガーゼにより連結した。この反応溶液から1. 1 k b p DNAのクローニングと同様の方法で、T T M - 1 の0. 4 k b p DNAを含む組み換えファージT T M - 1 Cを得た。

(5) 各組み換えファージから一本鎖DNAの調製

上記(4)で得られた二種類の組み換えファージについて、1 0 0 m 1 の2×Y T 培地で37°Cで増殖している大腸菌T G 1にm. o. i. = 0. 1になるようにそれぞれ加え、37°Cで5時間振盪培養後5 0 0 0 Gで30分遠心分離し、大腸菌菌体成分を除いた上清を取得する。この上清に0. 2倍量のポリエチレングリコール／塩化ナトリウム混合溶液(20%ポリエチレングリコール#6 0 0 0、2. 5 M NaCl)を加え4°Cで1時間静置後5 0 0 0 Gで20分遠心分離し、沈澱を回収する。この沈澱を5 0 0 μlのT E 緩衝液(1 0 mM Tris-HCl、1 mM EDTA、pH 8. 0)に溶かし、フェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈澱で各組み換えファージの単鎖DNAを回収した。

(6) 人工合成オリゴヌクレオチドをプライマーとする位置特異的変異体の作製

このようにして得られたDNAには、配列の途中にT G Aがある。このT G Aは、通常の細胞内では、終止コドンとして認識されてしまい、これより後ろに付加し

て いる 配 列 を 翻 訳 し な く な る。 そ こ で、 T G A 部 分 を メ チ オ ニ ヌ と し て 翻 訳 す る よ う に コ ド オ N N N の 第 3 番 目 の 塩 基 に 当 た る 塩 基 ア テ ニ ヌ を グ ア ニ ヌ に 改 变 す る た め に、 次 の 2 つ の オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド を 合 成 し た。

配 列 1 7

3' - T A C G T T C T T C C T G G C A A A C C T T A C C A C T A C T T - 5'

配 列 1 8

3' - C T A C A A A G A A C C T A A A T A T C A - 5'

配 列 1 7 (配 列 番 号 1 7) の オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド は
T T M - 1 N の 单 鎖

D N A と、 配 列 1 8 の オ リ ゴ ヌ ク レ オ チ ド は T T M - 1
C の 单 鎖 D N A と ア ニ ール さ せ、 F r i t s
E c k s t e i n ら の 方 法 (N u c. A c i d R e s.
8 7 4 9 - 8 7 6 4、 1 9 8 5) に よ っ て、 目 的 の 変
異 を お こ さ せ て、 得 ら れ た 組 み 換 え フ ァ ー ジ を 各々
T T M - 1 N' 、 T T M - 1 C' と 命 名 し た。 得 ら れ た
T T M - 1 N' 、 T T M - 1 C' フ ァ ー ジ D N A を そ れ
ぞ れ 制 限 酶 素 S a c I - E c o R I 、
E c o R I - B g I I I で 切 断 し、 0. 8 % 低 融 点 ア ガ ロ
ー ス 電 気 泳 動 に よ っ て 1. 1 k b p 、 0. 4 k b p の 断
片 を ア ガ ロ ー ス ゲ ル よ り 抽 出 し、 エ タ ノ ール 沈 濘 で 回 収 し た。
一 方 プ ラ ス ミ ド p U T T M - 1 も S a c I -
B g I I I で 切 断 し、 4. 8 k b p の ベ ク タ ー を 含 む 断 片
を 0. 8 % 低 融 点 ア ガ ロ ー ス ゲ ル 電 气 泳 動 か ら 回 収 し、
エ タ ノ ール 沈 濘 で 回 収 し た。 こ う し て 得 ら れ た 3 つ の 断

片をリガーゼにより連結し、かくして連結した3つの断片を用いてコンピテントな大腸菌T G 1 株を形質転換し、目的の位置に変異がおきたTTM-1'を持つプラスミドp UTTM-1'を得た。TTM-1'の塩基配列は、SangarらのDideoxy法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 74、5463(1977))によれば配列番号14に示す通りであった。これは、*M. gallisepticum*の40キロダルトンのTTM-1ポリペプチドと実質的に同一のものである。

参考例2 挿入用ベクターpNZ1729Rの構築

NP株のEcoRI断片(約7.3kbp)をpUC18のEcoRI切断部位(マルチクローニング部位の末端)に組み込んでプラスミドpNZ133(約10.0kbp)を得た。このプラスミドから、HpaI-SpeI断片(約3.0kbpのNP株由来断片)を切り出し、クレノー(Klenow)断片により平滑末端とした。またpUC18からRcoRI-HindIII断片(52bpのマルチクローニング部位)を除き、クレノー断片で平滑末端とした。この2つの断片をつないで、プラスミドとし、HpaI-SpeI断片中のEcoRV部位を除いて、そこにpUC18のEcoRI-HindIII断片(52bpのマルチクローニング部位)をHindIIIリンクー(5'-CAAGCTTG-3')とEcoRIリンクー(5'-GGAAATTCC-3')を用いて組み込み、

プラスミド pNZ133SR を構築した。

配列 2 (配列番号 2) と配列 3 (配列番号 3) (17
ベースの FVP プロモーターを含み、 lacZ のための
翻訳開始コドンが連なっている) をアニーリングして
本鎖にし、 lacZ 遺伝子 (pMC1871 及び
pMA001 由来、 Sirakawa et al.,
Gene, 28, 127-132, 1984) とアニー
リングした配列 4 (配列番号 4) と配列 5 (配列番号
5)、配列 6 (配列番号 6) と配列 7 (配列番号 7)、
配列 8 (配列番号 8) と配列 9 (配列番号 9)、配列 1
0 (配列番号 10) と配列 11 (配列番号 11) とを結
合させ (配列 3 の 5' 側末端の AGC の次の T から配列
5 の 3' 側末端の G の前の C までに塩基配列 TTTTT
TTTTTTTTTTTTTTGGCATATAAAA
TAATAAAATACAATAATTAAATTACGC
GTAAAAAATTGAAAAAACTATTCTAAT
TTATTGCACTC で示されるポックスウイルスの
合成プロモーターの改変物を含み、さらにマルチクロー
ニング部位及び両方向のポックスウイルス初期転写終結
信号 (配列番号 12) (Yuen et al.,
Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.,
88, 6417-6421, 1989 年) が連なってい
る)、EcoRI-HindIII 断片 (約 3.5 kbp)
を得た。その EcoRI-HindIII 断片を、pNZ
133SR に挿入し、プラスミド

pNZ1729Rを完成させた。

実施例 1

組み換え用プラスミドpNZ7929-R1の構築 (第3図参照)

(1) 合成プロモーターとTTM-1'遺伝子を結合したプラスミドpUTTM1Pの構築

参考例1で得たTTM-1'DNA全長を含むプラスミドpUTTM1' (WO 93/24646公報参照)のうちTTM-1'タンパク質の開始コドンにあたるATGの上流に制限酵素DraI切断部位をつくるために、まず次のオリゴヌクレオチドを合成した。

配列 1 9

3' - TATAGAATTAAATTTACTTATTC - 5'

つぎに、pUTTM-1'を制限酵素SacIとEcoRIで消化後約2300bpの断片を回収し、M13mp10のSacIとEcoRIで開裂させた断片と連結し組み換えファージTTM-1'を得た。上記オリゴヌクレオチドと单鎖TTM-1'とをアニールさせ、Frits Ecksteinらの方法によって目的の変異をおこさせた。この変異組み換えファージDNAを制限酵素SacIとEcoRIで消化後約2300bpの断片を回収し、再びpUTTM-1'をSacIとEcoRIで消化したベクターを含んだ断片にクローニングし、pUTTM1Dを得た。

合成プロモーターは配列-20と配列-21のDNA

を合成し、アニーリングして末端に制限酵素 Hind III と Hinc II 切断部位ができるように作製した。

配列-20 5' - AGCTTTTTTTTTTTTTGGCATATAATAATAATAATAATTACCGCTAAAAATT

配列-21 3' - AAAAAAAAACCCATATTATTTATTTATCTTATTAAATCGGCATTTTAA
Hind III

GAAGAACTATTCTAATTATTGCACTCGTC -3'

CTTTTGATAAGATTAAATAACGTGAGCAG -5'

Hinc II

最後に、PUTTM1D の制限酵素 Dra I と Bgl II による消化回収断片 1200 bp と上記合成プロモーターと pUC18 の Hind III, BamHI 開裂断片を連結し、約 4.0 kb p のプラスミド PUTTM1P を得た。

(2) pNZ7929R1 の構築

(1) において得られたプラスミド pUTTM1P を制限酵素 Hind III と Kpn I で消化後、約 1300 bp の断片を回収する。次に、参考例 2 で得た F PV 組み換え用ベクター - pNZ1729R (EP-A-0520753 号) を制限酵素 Hind III と Kpn I で開裂させた。この二つの断片を連結し、目的の組み換え用ベクター - pNZ7929-R1 (約 10.3 kb p) を得た。

(3) 組み換え F PV fNZ7929-R11 の作製と純化

単層の CEF に鶏痘生ワクチン株である NP 株を

m. o. i. = 0. 1 で感染した。3 時間後、これらの細胞をトリプシン処理で剥がし、細胞懸濁液とした。この懸濁液の 2×10^7 個の細胞と $10 \mu\text{g}$ の組み換え用プラスミド pNZ7929-R1 を混合し、
S a l i n e G (0. 14 M NaCl, 0. 5 mM
KCl, 1. 1 mM Na_2HPO_4 , 1. 5 mM
 KH_2PO_4 , 0. 5 mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
0. 011% グルコース) に懸濁し、室温においてジンバルサー (Bio-Rad 社) を用いて
3. 0 kV cm⁻¹, 0. 4 msec, 25 °C の条件下でエレクトロポレーションした。プラスミドを導入した細胞を、その後 37 °C, 72 時間培養し、3 回の凍結融解によって細胞を溶解し、組み換えウイルスを含むウイルスを回収した。

回収した組み換えウイルスはつぎのようにして選択した。回収したウイルス液を单層の CEF に感染させ生育培地を含んだ 10 ml の寒天溶液を重層した。室温中で寒天を固めたのち、FPV のブラークが出現するまで 37 °C で培養後ブルオギャル (Bluo gal) を $200 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度でふくんだ寒天培地を重層し、さらに 48 時間 37 °C で培養した。全ブラークのうち約 1% のブラークが青く発色した。これらの青いブラークを単離・回収して、さらに同様の操作によって単離・回収を繰り返し、すべてのブラークがブルオギャルで青く染まるまでウイルスの純化を行った。通常、この繰り返し操作は 3 ~ 4

回で終了する。この純化されたウイルスを f N Z 7 9 · 2 9 - R 1 と名付けた。f N Z 7 9 2 9 - R 1 はドットプロットハイブリダイゼーション、サザンプロットハイブリダイゼーションによって、組み込んだ各DNAの位置を確認した。

実施例 2 70Kタンパク質DNAの取得

(1) マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノムDNAの調製

上記参考例1(1)と同様にしてマイコプラズマ・ガリセプティカムS 6 株を用いて、マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノムDNA 200 μ gを得た。

(2) ゲノムDNAライブラリーの作製

(1) で得たマイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノムDNA 40 μ gに制限酵素A 1 u Iを4ユニット加え、37°C、10分間インキュベートして部分切断した。この部分切断したゲノムDNAを0.8%低融点アガロースゲル電気泳動に供し、約1.0 kbp ~ 4.0 kbpの鎖長のDNA断片をゲルより回収し、フェノール処理し、さらにエタノール沈澱により4 μ gのA 1 u I部分切断DNA断片を得た。

A 1 u I部分切断DNA断片1.2 μ gに最終濃度80 μ MになるようにS-アデノシル-L-メチオニンを添加し、さらにEco RIメチラーゼを20ユニット加えて、Eco RI認識配列中のデオキシアデノシン部位をメチル化し、当該配列をEco RIに対し非感受性と

した。このDNA断片にEco RI リンカーをリガーゼにより接続し、さらに入gt11 DNAのEco RI 切断断片と混合しリガーゼで連結した。この反応溶液を用い、常法 (DNA Cloning, VOL 1, A Practical Approach Edited by D. M. Glover) に従ってインビトロ パッケージング (in vitro packaging) を行ない、さらに大腸菌Y1088 株 (アマシャム社) に形質導入し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピルチオ- β -D-ガラクトピラノシド0.03 mMを含むLB寒天培地で37°C 12時間培養した。形成したプラークのうち、白プラーク数でライブラリーサイズを見積り、10⁶ pfu (プラークフォーミングユニット) のDNAライブラリーを作成した。

(3) ゲノムDNAライブラリーのイムノスクリーニング
(2) で作製したDNAライブラリーから得たファージを、プラークが1枚の8cm ϕ プレートに500~1000個生じるように、10mM MgSO₄ 水溶液に懸濁した大腸菌Y1090株 (アマシャム社) に加え、15分間吸着させた。さらに45°Cに加温したLB軟寒天培地を2.5mL加え、LB寒天培地に重層し、42°Cで3~4時間インキュベートした。ナイロンメンブレンフィルターを10mM IPTG水溶液に浸し、風乾し

た後、上記プレートに重層し、さらに37°Cで2~3時間インキュベートした。インキュベート後、ナイロンメンブレンフィルターをプレートより剥し、TBS(50 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl)でフィルターを洗浄した。さらにフィルターをスキムミルクを2%含むTBSに30分浸したのち、TBSで500倍に希釈した抗マイコプラズマ鶏血清で1時間処理をした。その後、TBSに15分間浸しフィルターを洗浄し、フィルターはさらに界面活性剤(Tween 20)を0.05%含むTBSに10~15分間浸して洗浄した。この工程を4~5回繰り返した後、フィルターをニワトリIgGに対するビオチン化抗体で60分間処理した。二次抗体で処理した後、Tween 20を0.05%含むPBSで5~6回フィルターを洗浄、これをさらにホースラディッシュペルオキシダーゼーアビジンD溶液に浸し、60分間処理した。処理後、Tween 20を0.05%含むPBSで5~6回フィルターを洗浄し、さらに、pH 8.0の10 mM Tris-HClで洗浄後、フィルターを4-クロロナフトール及び過酸化水素水を含むバッファーに浸した。これら一連の操作によりマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の抗原蛋白を発現しているプレートだけが紫色に発色した。

約 5×10^4 プラークを上記イムノスクリーニングすることで50個のポジティブなプラークが得られた。

(4) イムノポジティブ組み換え λ g t 1 1 ファージ

D N A の調製

大腸菌 Y 1 0 9 0 株をアンピシリン 5 0 μ g / m l を含む L B 培地で 3 7 °C、1 2 時間前培養し、培養液を 1 0 倍容量の 1 0 mM Mg SO₄ 含有 L B 培地に加えた。次いで (3) で得たイムノスクリーニングでポジティブとなった組み換え λ g t 1 1 ファージを m. o. i. = 0. 0 5 になるように加え、3 7 °C で 5 ~ 1 0 時間培養した。大腸菌を溶菌後、8, 0 0 0 r p m、1 0 分間遠心し、上清を得、この上清に等容量の TM バッファー (5 0 mM Tris - HCl pH 7. 4、1 0 mM Mg SO₄) および 0. 0 1 6 mg / m l になるように DNase I を加え、1 5 分間インキュベートした。これに 0. 5 M になるように NaCl を、また、0. 1 g / m l になるようにポリエチレングリコール (PEG 6 0 0 0) を加え、0 °C で 1 5 分間振盪した。これを 1 0, 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心して上清を除き、得られたペレットを 1 / 1 0 0 容量の TM バッファーに溶解し、さらに等容量のクロロホルムを加え激しく攪拌した。1 5, 0 0 0 r p m で 1 0 分間遠心し組み換え λ g t 1 1 ファージを水層に集め、ファージ液を得た。

上記ファージ液に最終濃度がそれぞれ 0. 0 2 5 M、1 %、1 mg / m l になるように EDTA、SDS、プロナーゼ E を加え、3 7 °C で 4 時間インキュベートした後、液をフェノール抽出し、エタノール沈殿でクローン

化抗原DNA(M-81)を含む λ gt11ファージDNAを得た。

(5) 組み換えプラスミド(pM-81)の作製

(4) で得た組み換え λ gt11ファージDNAを制限酵素EcoRIで消化後、0.8%低融点アガロースゲル電気泳動に供した。 λ gt11ファージのゲノムDNAのクローニングサイトに組み込まれたマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノムDNA断片は約2.8kbpの鎖長を示した。このDNA断片をアガロースゲルより抽出し、さらにフェノール・クロロホルム(1:1)で抽出し、エタノール沈澱で回収した。一方、プラスミドpUC18を同じくEcoRIで消化した後、フェノール・クロロホルムで抽出し、エタノール沈澱により開裂したpUC18を回収した。次いで5'末端リン酸をアルカリフォスファターゼ処理により除去し、pUC18DNAを再びフェノール・クロロホルム抽出後、エタノール沈澱によってDNAを回収した。

開裂したpUC18とマイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム由来の前記EcoRI消化物(約0.8kbp)をリガーゼにより連結し、かくして連結した断片でコンピテントな大腸菌TG1株を形質転換し、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピルチオ- β -D-ガラクトピラノシド0.03mM、40 μ g/mlアンピシリンを含むLB寒天培地で37°C、15時間培養

した。寒天培地上に生育した形質転換大腸菌のうち白コロニーを $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ アンピシリンを含む LB 液体培地で 37°C 、15 時間培養し、ビルンボイムとドーリーの方法 [Nuc. Acid Res. 7 1-513~(1979)] でプラスミドを抽出し、EcoRI で消化後、0.8% 低融点アガロース電気泳動によって、もとのマイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム由来の EcoRI 断片と同じ長さの DNA 断片を含む組み換えプラスミドを検出し、これを pM-81 と命名した。

(6) M-81 DNA をプローブにしたマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノミックサザンハイブリダイゼーション

上記(5)で取得した pM81 $1 \mu\text{g}$ を EcoRI と HindIII で消化し、0.6% 低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液 (0.5M NaOH、1.5M NaCl) に 10 分間浸し DNA を変性させ、中和液 (3M 酢酸ナトリウム pH 5.5) に 10 分間浸して中和の後 6 倍 SSC 液 (0.7M NaCl、0.07M クエン酸ナトリウム、pH 7.5) 中でナイロンメンブレンに転写した。風乾の後 80°C で 2 時間焼き付け、4 倍 SET (0.6M NaCl、0.08M Tris-HCl、4mM EDTA、pH 7.8) - 10 倍 Denhardt's 0.1% SDS - 0.1% $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$ - $50 \mu\text{g}/$

m 1 変性サケ精子DNAとpM-81（このプラスミド内にM-81遺伝子が含まれている）を常法に従い標識したものを加えて、68°C 14時間ハイブリダイゼーションをした。ナイロンメンブレンとX線フィルムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、M-81はマイコプラズマ・ガリセプティカムの約5.0 kbpの断片にハイブリダイズしていることを確認した。

(7) EcoRI、HindIII消化約5.0 kbp断片のpUC19へのクローニング及びコロニーハイブリダイゼーション

上記(6)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA 4 μgを制限酵素EcoRIおよびHindIIIで消化後、0.6%低融点アガロースゲル電気泳動後、約5.5 kbpの断片を回収した。この断片を、EcoRIおよびHindIII消化によって開裂したpUC-19とリガーゼによって連結し、連結した断片でコンピテントな大腸菌TG1株を形質転換し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピルチオ-β-D-ガラクトピラノシド0.03mM、40 μg/mlアンピシリンを含むLB寒天培地で37°C、15時間培養した。この培地上に生育した白コロニーをナイロンメンブレンに転写し、上記(2)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行ない、オートラジオグラフィーで確認したところ、クローニングされていることが判明し、

このプラスミドをpUM-81と名付けた。

(8) pUM-81インサートDNAの配列分析

上記(7)で作製したpUM-81内に挿入された約5.0kbの断片の配列をSangerらのDideoxy法によって解析した。

この断片中に存在するオープンリーディングフレーム(以下ORFという)の制限酵素切断点地図を第1図に示し、このORFの塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を配列番号1に示す。このORFから推定されるポリペプチドをTM-81ポリペプチドと命令した。

実施例3

シグナル膜アンカーDNAの下流にTTM-1'タンパク質DNAが連結したハイブリッドDNAを有する組み換えFPVの構築

(1) 合成プロモーターのpUC18へのクローニング
(第4図参照)

両端にHindIIIとBamHIの制限酵素切断部位をもつ次のような合成プロモータを合成した。

HindIII

配列22 5'- AGCTTTTTTTTTTTTTTTGGCATATAATAATAATAACATAATTACGC
配列23 3'- AAAAAAAACCGTATATTATTTATGTTATTAAATTAATGCG

GTAAAAAATTGAAAAACTATTCTAATTATGCACTCG -3'

CATTTTAACCTTTGATAAGATTAAATAACGTGAGCTAG -5'

BamHI

この合成DNAとpUC18のHindIII, BamHI開裂断片と連結し、約2.8kbのプラス

ミド p U C 1 8 Pを得た。

(2) NDVのHNタンパク質をコードする遺伝子と合成プロモーターの連結（第4図参照）

NDVのHN遺伝子を持つプラスミドXLIII-10HをSac Iで完全消化後、Ava IIで部分消化して約1800bpの断片を0.8%低融点アガロースゲル電気泳動によって回収した。この断片のAva II側にBamHI切断部位を作るため下記のDNAを合成した。

	<u>BamHI</u>	<u>AvaiI</u>
配列-24	5' - GATCCAGCATG	- 3'
配列-25	3' - GTCGTACCTG	- 5'

この合成DNAとHNを含む約1800bpのDNA断片と、p U C 1 8 PをBamHIおよびSac Iで完全消化後、2.0%低融点アガロースゲル電気泳動によって回収した合成プロモーターを含む断片の三断片をリガーゼで連結させて、これら三断片が連結したプラスミドを抽出し、得られた約4.6kbpのプラスミドをpNZ87Nと命名した。

(3) pNZ7929-R1のAlu I切断点のEcoRI切断点への変換（第3図および第5図参照）

配列番号14の279塩基部分の制限酵素Alu I切断部位をEcoRI切断部位に変換するために以下のオリゴヌクレオチドを合成した。

配列-26 5' - GGGATTCGAATTCTATGTCT - 3'

pUTT M1PをHindIII, KpnIで消化後約13

0 0 b p の断片を回収し、M 1 3 m p 1 0 の Hind III, Kpn I で開裂させた断片と連結し单鎖組み換えファージを得た。上記オリゴヌクレオチドと单鎖組み換えファージとをアニールさせ、Frits Eckstein 等の方法によって目的の変異をおこさせた。この変異組み換えファージDNAを制限酵素 Hind III, Kpn I で消化後約 1 3 0 0 b p の断片を回収し、これと pNZ1729R を制限酵素 Hind II I, Kpn I で開裂させた断片とをリガーゼにより連結し、pNZ7929-R1 の Alu I 切断点が Eco RI 切断点へと変換されたプラスミド pNZ7929-R2 (約 1 0. 3 k b p) を得た。

(4) 組み換えFPV用プラスミド

pNZ2929XM1 の構築 (第 6 図(A) 及び第 6 図(B) 参照)

まず、pNZ87N を制限酵素 Xba I で完全消化し、クレノーフラグメントで切断点を平滑末端にした後 Eco RI リンカー (5' - G G A A T T C C - 3') を加えてリガーゼで連結した。このプラスミドを Eco RI, Hind III で消化して約 3 0 0 b p の断片を 1. 2 % 低融点アガロースゲル電気泳動によって回収した。次に、pNZ7929R2 を制限酵素 Eco T22 I で消化し、Eco RI で部分分解し、TTM-1 DNA の一部である約 5 5 0 b p の断片を 0. 8 % 低融点アガロースゲル電気泳動によって回収し

た。また、pNZ7929R1を制限酵素EcoT22I, HindIIIで消化し、約9.4kbpの断片を0.8%低融点アガロースゲル電気泳動によって回収した。これらの断片をリガーゼにより連結し、上記の三断片が連結したプラスミドを抽出し、得られた約10.35kbpのプラスミドをpNZ2929XM1と命名した。

(5) 組み換えFPV fNZ2929XM1の作製と純化

実施例1(3)と同様の方法で構築、純化した。この純化されたウイルスをfNZ2929-XM1と名付けた。fNZ2929-XM1はドットプロットハイブリダイゼーション、ササンプロットハイブリダイゼーションによって、組み込んだ各DNAの位置を確認した。

実施例4

fNZ7929-R1とfNZ2929XM1感染細胞におけるTTM-1ポリペプチドの発現

fNZ7929-R1とfNZ2929XM1がTTM-1ポリペプチドを感染細胞中で発現することを調べるために抗マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株血清を用いた免疫蛍光抗体法を行った。fNZ7929-R1およびfNZ2929XM1をCEFに感染させ、37°Cでブラークが出現するまで培養後冷アセトンで固定し、マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株で免疫した鶏血清(抗S6)またはマイコプラズマ・ガリセプ

ティカム S 6 株感染鶏血清 (S 6 感染) 及び T T M - 1 ポリペプチド免疫鶏血清 (抗 T T M G - 1) を一次抗体として 100 ~ 1000 倍に希釀して反応させた。これらの培養細胞をさらに、蛍光物質 (F I T C) を結合した抗鶏イムノグロブリンと反応させ、非特異反応部分を洗い流したのち蛍光励起波長光下で顕微鏡観察した。また、アセトン固定を行わなかった感染細胞 (即ち、未固定細胞) についても同様に反応性を調べた。対照ウイルスとして F P V - N P 株, f N Z 2 3 3 7 (特開平 1 - 157381) を用い、対照一次抗体としてニューカッスル病ウイルス免疫鶏血清 (抗 N D V) と S P F 鶏血清 (S P F) を 1000 倍で用いた。反応性は表 1 に示した。

表1 組み換えウィルス感染CEPの各種抗血清に対する反応性

感染ウイルス (アセトン固定 の有無)	一次抗体にたいする反応性				
	抗S6	感染S6	抗TTM-1	抗NDV	SPF
fNZ2929XM1 (アセトン固定)	++	++	++	-	-
(未固定)	+	+	+	-	-
fNZ7929-R1 (アセトン固定)	+	+	-	-	-
(未固定)	±	±	±	-	-
fNZ2337 (アセトン固定)	-	-	-	+	-
(未固定)	-	-	-	+	-
NP (アセトン固定)	-	-	-	-	-
(未固定)	-	-	-	-	-
- (アセトン固定)	-	-	-	-	-
(未固定)	-	-	-	-	-

++ : 強く反応 + : 反応 ± : 弱く反応 - : 反応しない

この結果から、本発明の組み換えウィルスである f NZ 7 9 2 9 - R 1 および f NZ 2 9 2 9 X M 1 が感染した細胞は、抗 S 6 、 S 6 感染、抗 T T M - 1 に反応する。また、 f NZ 7 9 2 9 - R 1 は未固定の完成細胞においても抗 S 6 、 S 6 感染、抗 T T M G - 1 と反応することがわかった。このことは f NZ 2 9 2 9 X M 1 は T T M G - 1 ポリペプチドを感染細胞中で発現しているばかりではなく、感染細胞表面に T T M - 1 ポリペプチドを呈示させていることを示している。

実施例 5

組み換えF PV接種鶏の抗体誘導能

f NZ 7 9 2 9 - R 1 および f NZ 2 9 2 9 X M 1 を

C E F で 3 7 °C, 4 8 時間培養後、二回凍結融解を繰り返し、細胞浮遊液を回収し、ウイルスタイターが 1 0⁶ p f u / m l となるように調製したのち生後 7 日の S P F 鶏 (Line M, 日本生物科学研究所) の右翼膜に穿刺用針で 1 0 μ l 接種した。接種後全鶏発痘を観察し、接種から 2 週後に血清を採取した。採取した血清の抗体価は E L I S A 法で測定した。精製した T T M - 1 ポリペプチドを 1 μ g / well となるようにバイカーボネットバッファーに溶解し、9 6 well マイクロタイプレートに吸着させた後、スキムミルクでブロッキングを行ってその後の非特異的吸着を防いだ。次に各ウェルに被検血清の希釈液をのせたのちホースラディッシュパーオキシダーゼ結合抗鶏イムノグロブリン抗体 (ウサギ抗体) を二次抗体としてのせた。充分洗浄したのち、基質として 2, 2' - アジノジエチルベンズチアゾリンスルフォネートを加え、イムノリーダーで 4 0 5 n m の波長光に対する吸光度で抗体の相対希釈倍率を測定した。なお、対照一次抗体には、抗 T T M - 1 ポリペプチド鶏血清を用いた。結果は表 2 に示す。

表2 fNZ2929XM1接種鶏のTTM-1ポリペプチドに対する抗体価

接種ウィルス	抗TTM-1 ポリペプチド抗体価（希釈倍率）*
fNZ2929XM1	256
fNZ7929-R1	32
NP	1
—	1
抗TTM-1 ポリペプチド	256

* SPF 鶏血清を1 としたときの希釈倍率

** 非接種

この結果から、本発明の組み換えウィルスである、fNZ2929XM1もfNZ2929-R1も共に抗TTM-1ポリペプチド抗体を誘導でき、鶏痘とマイコプラズマ・ガリセプティカム感染症に対して効果的に感染を防御するワクチンとして使用することができる事が判った。

実施例 6

TM-67を有する組み換えアビポックスウィルスfNZ7929-67の取得

(1) TM-67遺伝子をプローブにしたマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノミックサザンハイブリダイゼーション

参考例(1)で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA $1 \mu\text{g}$ をXba Iで消化し、0.6%低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液(0.5M NaOH, 1.5M NaCl)に10分間浸しDNAを変性させ、中和液(3M酢酸ナ

トリウム pH 5.5) に 10 分間浸して中和の後 6 倍 S S C 液 (0.7 M NaCl、0.07 M クエン酸ナトリウム、pH 7.5) 中でナイロンメンブレンに転写した。風乾の後 8.0 °C で 2 時間焼き付け、4 倍 S E T (0.6 M NaCl、0.08 M Tris-HCl、4 mM EDTA、pH 7.8) - 10 倍 Denhardt - 0.1% SDS - 0.1% Na₄P₂O₇ - 50 μg/ml 変性サケ精子DNA と pUM-1 (特開平2-111795号参照) を常法に従い標識したものを加えて、68 °C 14 時間ハイブリダイゼーションをした。ナイロンメンブレンと X 線フィルムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、参考例 1 (2) で確認された断片とは異なる約 3.4 kbp の断片にハイブリダイズしていることを確認した。

(2) XbaI 消化約 3.4 kbp 断片の pUC-19 へのクローニング及び配列分析

参考例 1 (1) で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA 4 μg を制限酵素 XbaI で消化後、0.6% 低融点アガロースゲル電気泳動後、上記実施例 6 (1) で確認した約 3.4 kbp の断片を回収した。この断片を、XbaI 消化によって開裂した pUC-19 とリガーゼによって連結し、コンピテントな大腸菌 TG1 株を形質転換し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド 0.003%、イソプロピルチオ-β-D-ガラクトピラノシド

0.03 mM、40 μg/ml アンピシリンを含むLB寒天培地で37°C、15時間培養した。この培地上に生育した形質転換大腸菌のうち白コロニーを40 μg/ml アンピシリンを含むLB液体培地で37°C、15時間培養し、ビルンボイムとドーリーの方法でプラスミドを抽出し、Xba Iで消化後0.8%低融点アガロース電気泳動によって、元のMGのXba I断片と同じ長さを含む組み換えプラスミドを検出し、pUM67と名付けた。

pUM67内に挿入された約3.4 kbpの断片を SangerらのDideoxy法によって解析した。この断片中に存在するオープンリーディングフレーム(ORF)の制限酵素地図を第8図に示し、このORFの塩基配列及びアミノ酸配列を配列番号27に示す。このORFから推定されるポリペプチドをTM-67と命名した。

(3) TM-67のORFのTGAが翻訳終結コドンとして読まれないように改変(TGA→TGG)した遺伝子を含むプラスミドpTM67の作製(第8図および第9図(A))

TM-67のORFの下流部分にTGAコドンが集中しているので、全てのTGAコドンを含むEcoRI、PstI断片約1300bpをpUM67から回収し、EcoRIとPstIで開裂させたpUC19に連結し、PUC-T1(4.0 kbp)を取得した。次に、PUC-T1を鋳型とし、TGAをTGGにポリメラーゼチエ

ンリアクション法（P C R 法：S c i e n c e , 2 3 0 , 1 3 5 0 ~ 1 3 5 4 (1 9 8 5)) にて変換させるために配列番号 2 8 ~ 3 3 に示す P C R 法用プライマー D N A を合成した。

P C R 法に使用した配列番号 2 8 ~ 3 3 に相当するプライマー 1 ~ 6 は以下の通りである。

2 8 プライマー-1 5' -GTTTCCCAGTCACGAC-3' (M13 primer)

2 9 プライマー-2 3' -AACCAACCAACCCCGATCGCTAGTCT-5'

Nhe I

3 0 プライマー-3 5' -TGATTGGGCGCTAGCGATCA-3'

Nhe I

3 1 プライマー-4 3' -TCCCAACCTTGTCGAAATACAA-5'

Hind III

3 2 プライマー-5 5' -TGAAACAAAGCTTTATGTT-3'

Hind III

3 3 プライマー-6 3' -CAGTATCGACAAAGGAC -5' (M13 RV primer)

P C R 法の常法に従い、プライマー 1 とプライマー 2 を用いて 6 0 0 b p の断片、プライマー 3 とプライマー 4 を用いて 3 6 0 b p 、プライマー 5 とプライマー 6 を用いて 3 4 0 b p の断片を增幅後回収した。さらに、6 0 0 b p の断片を E c o R I と N h e I で消化、3 6 0 b p の断片を N h e I と H i n d III で消化、3 4 0 b p の断片を H i n d III と P s t I で消化後、それぞれ

2. 0 % 低融点アガロースゲル電気泳動に供しアガロースから回収した。各断片をクローニングするため、pUC19及びpUC18をDraIで開裂させた後、XhoIリンカーを挿入したプラスミドpUC19X、pUC18Xも取得した。各制限酵素で処理回収した600bpの断片及び360bpの断片と、pUC19XをEcoRIとHindIIIで開裂させて得られた断片とをリガーゼにより連結し、得られたプラスミドを抽出しこれをpUC19XL（約3.6kbp）と命名した。HindIIIとPstIで消化した340bp断片は、pUC18をHindIIIとPstIで開裂させて得られた断片とリガーゼにより連結し得られたプラスミドを抽出し、これをpUC18R（約3kbp）と命名した。pUC19XLをHindIIIとXhoIで消化した約2.5kbpの断片と、pUC18RをHindIIIとSpeIで消化した180bpの断片とpUC18Xを、XbaIとXhoIで消化した1.1kbpの断片を、それぞれアガロースゲル電気泳動に供した後回収し、これらをリガーゼで連結し、得られたプラスミドを抽出し、これをpTM67（約3.7kbp）を取得した。

(4) pNZ7929-67の構築（第9図（B））

実施例1(1)で得られたpUTTM1PをSpeIとKpnIで消化後アガロースゲル電気泳動に供し、3.9kbpの断片を回収した。同様にpTM67もSpeIとKpnIで消化後アガロース電気泳動に供し、

0. 9 k b p の断片を回収、これを前記 3. 9 k b p 断片とリガーゼにより連結し、得られたプラスミド、pUTM67 (4. 8 k b p) を回収した。さらにこの pUTM67 を KpnI 消化後、HindIII で部分消化し、アガロースゲル電気泳動に供し、2. 1 k b p の断片を回収し、この断片を pNZ1729R (参考例 2 参照) の HindIII と KpnI で開裂させて得られた 9. 0 k b p の断片とリガーゼで連結し、プラスミド pNZ7929-67 (11. 1 k b p) を取得した。

(5) 組み換えアビポックスウィルス

fNZ7929-67 の作製と純化

上記(4) で得た pNZ7929-67 を用い実施例 1 (3) と同様の操作を繰り返し、fNZ7929-67 を取得した。

実施例 7

TM-66 を有する組み換えアビポックスウィルス fNZ7929-66 の取得

(1) TM-66 遺伝子をプローブにしたマイコプラスマ・ガリセプティカムのゲノミックサザンハイブリダイゼーション

参考例 1 (1) で取得したマイコプラスマ・ガリセプティカム DNA 1 μ g を XbaI で消化し、0. 6 % 低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液 (0. 5 M NaOH, 1. 5 M NaCl) に 10 分間浸し DNA を変性させ、中和液 (3 M 酢酸ナ

トリウム pH 5.5) に 10 分間浸して中和の後 6 倍 S S C 液 (0.7 M NaCl、0.07 M クエン酸ナトリウム、pH 7.5) 中でナイロンメンブレンに転写した。風乾の後 8.0 °C で 2 時間焼き付け、4 倍 S E T (0.6 M NaCl、0.08 M Tris-HCl、4 mM EDTA、pH 7.8) - 10 倍 Denhardt - 0.1% SDS - 0.1% Na₄P₂O₇ - 50 μg / ml 変性サケ精子DNA と pUM-1 (特開平2-111795号参照) を常法に従い標識したものを加えて、68 °C 14 時間ハイブリダイゼーションをした。ナイロンメンブレンと X 線フィルムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、約 6.3 kbp の断片にハイブリダイズしていることを確認した。

(2) Xba I 消化約 6.3 kbp 断片の pUC-19 へのクローニング及び配列分析

参考例 1 (1) で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカムDNA 4 μg を制限酵素 Xba I で消化後、0.6% 低融点アガロースゲル電気泳動後、上記実施例 7 (1) で確認した約 6.3 kbp の断片を回収した。この断片を、Xba I 消化によって開裂した pUC-19 とリガーゼによって連結し、コンピテントな大腸菌 TG 1 株を形質転換し、5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル-β-D-ガラクトピラノシド 0.003%、イソプロピルチオ-β-D-ガラクトピラノシド 0.03

$10 \mu g / ml$ アンピシリンを含む LB 寒天培地で $37^\circ C$ 、15 時間培養した。この培地上に生育した白コロニーをナイロンメンブレンに転写し、上記(1)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行ない、オートラジオグラフィーで確認したところ、クローニングされていることが判明し、このプラスミドを pUM66 (約 9 kb p) と名付けた。

pUM66 内に挿入された約 6.3 kb p の断片を Sanger らの Dideoxy 法によって解析した。この断片に存在する ORF の制限酵素地図を第 10 図に示し、この ORF の塩基配列およびアミノ酸配列を配列番号 1 6 に示す。

この ORF から推定されるポリペプチドを TM-66 と名付けた。

(3) TM-66 をコードする ORF の TGA が翻訳終止コドンとして読まれないように改変 (TGA \rightarrow TGG) した pTM66 の作製 (第 10 図および第 11 図 (A) ~ (C))

TM-66 の ORF の TGA コドンを TGG コドンに改変するにあたって、TM-67 と同様ポリメラーゼチャーンリアクション法 (PCR 法: Science, 230, 1350 ~ 1354 (1985)) を用いて変換した。変換用に合成した PCR 法用 PNA プライマーを配列番号 3 4 ~ 4 3 に示す。

PCR 法を使用した配列番号 3 4 ~ 4 3 に相当するブ

ライマーー1～10は以下の通りである。

ライマーー1 5' -CAGGAAACAGCTATGAC-3' (M13 RV primer)

ライマーー2 3' -GTTCTTCCCTGGCAAACTTA-5'

Ava II

ライマーー3 5' -AAGAAGGACCGTTGGAATG-3'

Ava II

ライマーー4 5' -GTTTCCCAGTCACGAC-3' (M13 primer)

ライマーー5 3' -CAAAGTACCTAAATATCGAATTCACCT-5'

Af1 II

ライマーー6 5' -ATAGCTTAAGTGGAACAAACACG-3'

Af1 II

ライマーー7 3' -GGAACCAGATCTTGTTCCC-5'

Xba I

ライマーー8 5' -GGTCTAGAACAAAGGGATTGGACA-3'

Xba I

ライマーー9 3' -CTACCTACCATGGTGATGAT-5'

Kpn I

ライマーー10 5' -GATGGTACCACTACTATTCATGGACA-3'

Kpn I

PUM66をBgl IIとSpe Iで消化し、約1.2 kbpの断片を0.5%低融点アガロースから回収し、BamHIとXba Iで開裂させたpUC19にリガ

ゼによって連結し、pUCT2 (3. 9 kbp) を取得した。次にpUCT2を鑄型とし、プライマー1とプライマー2を用いPCR法の常法に従い約620bpの断片、プライマー3とプライマー4を用い約550bpの断片を増幅後、回収した。さらに、約620bpの断片をHindIIIとAvallで消化、550bpの断片をAvallとBamHIで消化し、これら断片とHindIIIとBamHIで開裂させたpUC19とそれぞれリガーゼで連結し得られたプラスミドを抽出し、pUC19-1 (3. 9 kbp) と命名した。

次にpUCT2を鑄型にプライマー4とプライマー6を用い、PCR法の常法に従い約500bpの断片、を増幅後回収し、またpUCT-2を鑄型にプライマー1とプライマー5を用い約700bpの断片を増幅後回収した。さらに約500bpの断片をAflIIIとEcoRIで、約700bpの断片をHindIIIとAflIIで消化し、これらの断片をHindIIIとEcoRIで開裂させたpUC19とリガーゼで連結させ、得られたプラスミドを抽出し、pUC19-2 (約3. 9 kbp) と命名した。さらにpUC19-1をEcoRIで消化し、消化物を0. 6%低融点アガロースゲルにかけ約3. 3 kbpの断片を回収した。pUC19-2についてもEcoRIで消化し、2. 0%低融点アガロースゲルから約550bpの断片を回収し、これをpUC19-1由来の上記約3. 3 kbp断片とリ

ガーゼにより連結し、TM-66のORFの5'側2ヶ所のTGAコドンが、TGGに変更された断片を含むプラスミドpUC19Lを取得した。

TM66のORFの3'側2ヶ所のTGAコドンをTGGに偏向するため、まずpUM66をEcoRIとRvullで消化し約1720bpの断片を0.6%低融点アガローズゲールから回収し、pUC19をEcoRIとHincIIで開裂させたpUC19と連結させ、プラスミドpUCT3(約4.4Kbp)を取得した。

pUCT3を铸型にプライマー4とプライマー7を用い、PCR法の常法に従い約820bpの断片を、また、プライマー8とプライマー1を用い約900bpの断片をPCR法の常法に従いそれぞれ增幅後回収した。この820bpの断片を、EcoRIとXbaIで消化し、この消化物にXbaIをHindIIIで消化した上記約900bpの断片とHindIIIとEcoRIで開裂したpUC19とをリガーゼで連結させてプラスミドpUCT4(約4.4kbp)を取得した。次にpUCT-4を铸型として、プライマー4とプライマー9を用いPCR法の常法に従い約880bpの断片を、pUCT3を铸型としてプライマー1とプライマー10をPCR法の常法に従い約850bpの断片を增幅後それぞれ回収した。この880bpの断片をEcoRIとKpnIで消化し、HindIIIとKpnIで消化した上記850bpの断片と、EcoRIとHindIIIで開裂させたp

U C 1 9 とリガーゼによって連結させ、プラスミド p U C 1 9 R を取得した。

T M 6 6 の O R F の T G A コドンがすべて T G G に変更になったプラスミドを得るため、p U M 6 6 を M 1 u I と P v u I I で消化後、約 4. 8 k b p の断片を 0. 6 % 低融点アガロースゲルから回収し、この断片を p U C 1 9 R を M 1 u I と P s t I で消化した約 1. 0 k b p の断片とリガーゼによって連結させ得られてプラスミドを回収した。さらに、このプラスミドを E c o T 2 2 I と N h e I で消化した約 5. 2 k b p の断片と p U C 1 9 L を E c o T 2 2 I と N h e I で消化して得た約 6 4 0 b p の断片とをリガーゼにより連結し、T M - 6 6 の O R F 中の T G A コドンが、すべて T G G に変換された O R F 全長を含むプラスミドを取得しこれを p T M 6 6 (約 5. 8 k b p) と命名した。

(4) p N Z 7 9 2 9 - 6 6 の作製 (第 1 2 図)

p T M 6 6 を P s t I で消化後、S s p I で部分消化し、約 2. 4 k b p の断片を回収し、参考例の合成プロモーターの H i n d I I I 、 H i n c I I 消化断片と、 H i n d I I I と P s t I で開裂させた p U C 1 8 の三断片をリガーゼによって連結し、p U T M 6 6 P (約 5. 2 k b p) を取得した。次に p U T M 6 6 P を H i n d I I I と B a m H I で消化して、その消化物を用いて低融点アガロースゲルより回収した断片 (約 2. 5 k b p) を H i n d I I I と B a m H I で開裂させた

pNZ1729Rとリガーゼによって連結し、目的のプラスミドpNZ7929-66（約11.5kbp）を取得した。

(5) fNZ7929-66の作製と純化

上記(4)で得たpNZ7926-66を用い実施例1(3)と同様に操作を繰り返し、fNZ7929-66を取得した。

実施例8

fNZ7929-67、fNZ7929-66感染細胞におけるTM-67、TM-66ポリペプチドの発現 fNZ7929-67、fNZ7929XM66がTM67、TM66ポリペプチドを感染細胞中で発現することをしらべるために免疫蛍光抗体法を行なった。fNZ7929-67、fNZ7929-66をそれぞれ、CEFに感染させ、37°Cでプラークが出現するまで培養後冷アセトンで固定し、マイコプラズマ・ガリセプティカムS6免疫鶏血清または、マイコプラズマ・ガリセプティカム感染鶏血清を一次抗体として、100～1000倍に希釈して反応させた。これらの培養細胞をさらに、蛍光物質（FITC）を結合した抗鶏イムノグロブリンと反応させ、非特異反応部分を洗い流したのち蛍光励起波長光下で顕微鏡観察した。反応性は表3に示した。

表 3

組み換えウイルス感染CEFの各種抗血清に対する反応性

一 次 抗 体

感染ウイルス	抗S 6	感染S 6	SPF
f NZ 7 9 2 9 - 6 7	+++	+++	-
f NZ 7 9 2 9 - 6 6	+++	+++	-
f NZ 2 9 2 9 XM 1	++	++	-
NP	-	-	-

+++ : 全面に強く反応 ++ : 強く反応 + : 反応 - : 反応しない

この結果から、本発明の組み換えウイルスである f NZ 7 9 2 9 - 6 6 、 f NZ 7 9 2 9 - 6 6 、及び f NZ 2 9 2 9 XM 1 が感染した細胞のみに反応する抗 S 6 、 S 6 感染と反応することが判った。

実施例 9

組み換えFPV接種鶏の誘導抗体の生育阻止活性

f NZ 7 9 2 9 - 6 7 及び f NZ 7 9 2 9 - 6 6 をそれぞれ CEF で 37°C 、 48 時間培養後、二回凍結融解を繰り返し、細胞浮遊液を回収し、ウイルスタイマーが 10^6 pfu/m1 となるように調製したのち生後 7 日の SPF 鶏 (Line M, 日本生物科学研究所) の右翼膜

に穿刺用針で $10\mu l$ 接種した。接種後全鶏発痘を観察し、接種から2週後に血清を採取した。

一方、マイコプラズマ・ガリセプティカムS6株をPPLO液体培地（変法Chaneockの培地）に1.0%植菌し 37°C で3日間培養したあと、 $0.45\mu\text{m}$ のメンブレンフィルターを通して凝集菌体を取り除いたろ液を、菌体数が $10^3\text{ CFU}/\text{ml}$ になるようにPPLO液体培地で希釈し、活性測定用菌液とした。

この菌液を滅菌したポリプロピレン製のチューブに $400\mu l$ 分注し、標準鶏血清、TMG-1免疫血清（特開平2-111795号）、各種血清をそれぞれ $100\mu l$ 加えて、 37°C で2~5日間培養することにより生育阻止試験を行なった。

培養0、1、2、3、4日目に各マイコプラズマ・ガリセプティカム（以下MGと称す）生育阻止試験培養液から各 $10\mu l$ を採取し、PPLO寒天培地に広げ 37°C で7日間培養し、出現したコロニー数で対応する培養液中の菌数を演えきした。その3日目の菌数測定の結果を表4に示す。

表 4

試 料	3日目の菌数
S P F 鶏血清	1. 3×10^8
抗 T T M G - 1 鶏血清	1. 8×10^5
f N Z 2 9 2 9 X M I 接種鶏血清	4. 5×10^6
f N Z 7 9 2 9 - 6 7 接種鶏血清	2. 8×10^4
f N Z 7 9 2 9 - 6 6 接種鶏血清	3. 2×10^4

添加した試料が S P F 鶏血清または馬血清を加えた培地の培養液では、MG の増殖速度に差はなく、培養 3 日目で菌数は飽和に達した。f N Z 7 9 2 9 - 6 7、f N Z 7 9 2 9 - 6 6 接種血清を添加した培養液では f N Z 2 9 2 9 X M I はもちろん抗 T T M G - 1 鶏血清のように MG の生育を阻害する抗体を誘導する抗原を免疫した場合以上に効果的に MG の増殖を抑制している。このことから、T M 6 7 ポリペプチド、T M 6 6 ポリペプチドは、T T M G - 1 以上に MG の生育を抑制できる抗体を誘導できる抗原であることを示している。

実施例 1 0

マイコプラズマ・ガリセプティカムが発現しているポリペプチド D N A T M - 1 6 の取得

(1) マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム D

N A の調製

マイコプラズマ・ガリセプティカムS 6 株を 1 0 0 m l の P P L O プロス基礎培地に 2 0 % 馬血清、 5 % 酵母エキス、 1 % グルコース、 および pH 指示薬として フェノールレッドを微量加えて調製した液体培地で、 3 7 °C 3 ~ 5 日 培養した。マイコプラズマ・ガリセプティカムの増殖に従って培養液の pH が下がり、 培養液に含まれている pH 指示薬の呈色が赤から黄に変化した時点で、 培養を終了し、 培養液を 8 0 0 0 G、 2 0 分間遠心し、 集菌した。さらに菌体を培養液の 1 / 1 0 容量の P B S に懸濁し、 再び 1 0 , 0 0 r p m 、 2 0 分間遠心し、 集菌した。収集菌体を再び 2 . 7 m l の P B S に懸濁し、 1 % になる用に S D S を、 さらに 1 0 μ g の R N a s e を加え、 3 7 °C 3 0 分間インキュベートし溶菌した。

溶菌液を等容量のフェノールで 3 回抽出しさらに、 エチルエーテルで 3 回抽出を行なった後エタノール沈殿し、 マイコプラズマ・ガリセプティカム・ゲノム D N A 2 0 0 μ g を得た。

(2) M - 1 6 D N A をプローブにしたマイコプラズマ・ガリセプティカムのゲノミックサザンハイブリダイゼーション

上記 (1) で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカム D N A 1 μ g を X b a I で消化し、 0 . 6 % 低融点アガロースゲル電気泳動に供した。泳動後ゲルをアルカリ変性液 (0 . 5 M N a O H 、 1 . 5 M N a C l)

に 10 分間浸し DNA を変性させ、中和液 (3 M 酢酸ナトリウム pH 5.5) に 10 分間浸して中和の後 6 倍 S S C 液 (0.7 M NaCl、0.07 M クエン酸ナトリウム、pH 7.5) 中でナイロンメンブレンに転写した。風乾の後 80 °C で 2 時間焼き付け、4 倍 S E T (0.6 M NaCl、0.08 M Tris-HCl、4 mM EDTA、pH 7.8) - 10 倍 Denhardt - 0.1% SDS - 0.1% Na₄P₂O₇ - 50 μg/ml 変性サケ精子DNA と pUM-16 (このプラスミド内に M-16 遺伝子が含まれている; 特開平 2-111795 号参照) を常法に従い標識したものを加えて、68 °C 14 時間ハイブリダイゼーションをした。ナイロンメンブレンと X 線フィルムを重ね、オートラジオグラフィーで確認したところ、約 5.5 kbp の断片にハイブリダイズしていることを確認した。

(3) Xba I 消化約 5.5 kbp 断片の pUC-19 へのクローニング及びコロニーハイブリダイゼーション

上記 (1) で取得したマイコプラズマ・ガリセプティカム DNA 4 μg を制限酵素 Xba I で消化後、0.6% 低融点アガロースゲル電気泳動後、約 5.5 kbp の断片を回収した。この断片を、Xba I 消化によって開裂した pUC-19 とリガーゼによって連結し、コンピテントな大腸菌 TG1 株を形質転換し、5-プロモ-4

－クロロ－3－インドリル－ β －D－ガラクトピラノシド0.003%、イソプロピルチオ－ β －D－ガラクトピラノシド0.03mM、40 μ g/m1アンピシリンを含むLB寒天培地で37°C、15時間培養した。この培地上に生育した白コロニーをナイロンメンブレンに転写し、上記(2)と同様の方法でハイブリダイゼーションを行ない、オートラジオグラフィーで確認したところ、クローニングされていることが判明し、このプラスミドをpUM-16と名付けた。

(4) pUM-16インサートDNAの配列分析

上記(3)で作製したpUM-16内に挿入された約5.5kbの断片の配列をSangerらのDideoxy法(Proc. Natl. Acad. Sci. USA.、74、5463(1977)によって解析した。

この断片の制限酵素切断点地図を第13図に示す。また、この断片中に存在するオープンリーディングフレームの制限酵素切断点地図を第14図に示し、このORFの塩基配列及びそれから推定されるアミノ酸配列を配列番号15に示す。このORFから推定されるポリペプチドをTM-16ポリペプチドと命名した。

尚、以下にこの発明に使用する配列を配列リストとして記述するが、原則としてプライマーに使用した配列は3'側から表記した。ただし、明細書本文中で5'側から表記したプライマーは、そのまま5'側より表記

している。

配列リスト

(1) 一般情報

(i) 出願人：米国

中野克彦

斎藤修治

大川節子

塩野芳彦

入谷好一

青山茂美

高橋清人

佐伯早木子

大澤郁郎

船戸洋乃

米国以外の指定国

日本ゼオン株式会社

塩野義製薬株式会社

(ii) 発明の名称：新規なポリペプチド、同ポリペプチドをコードするDNA、同DNAを含む組み換えベクター、同組み換えベクターを利用した組み換えウイルス、およびその利用

(iii) 配列の数：43

(2) 配列番号1についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 2369
 (B) 配列の型: アミノ酸
 (C) 鎖の数: 二本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (E) 配列の種類: D N A
 (xi) 配列の表示: 配列番号 1

GTCTGGGGTT GGTTTGATCA GCGAAAATAA ACCCGATTAA TTACTTACTG AACTTTATAT	60
ATTCTTTAGA TAATAATAGA CGTGGTGAAC GTAAGTTATT GGCTTAACCT TAAGTGAAAA	120
GAACACAT TTTAAAGTTT CTTAGTTTAT TAGGTATATGT TTCGTTTGTA ATG TTA	176
	Met Leu
GCA GCT GCT AGT TGT ACT TCA GCA GCT ACA CCA ACT CCA AAC CCT GAA	224
Ala Ala Ala Ser Cys Thr Ser Ala Ala Thr Pro Thr Pro Asn Pro Glu	
5 10 15	
CCA AAA CCA ACT CCA AAC CCT GAA CCA AAA CCA GAT CCA ATG CCA AAC	272
Pro Lys Pro Thr Pro Asn Pro Glu Pro Lys Pro Asp Pro Met Pro Asn	
20 25 30	
CCT CCT AGT GGT AAC ATG AAT GGT GGA AAC ACC AAC CCA AGT GAT	320
Pro Pro Ser Gly Gly Asn Met Asn Gly Gly Asn Thr Asn Pro Ser Asp	
35 40 45 50	
GGG CAA GGC ATG ATG AAT GCA GCT GCT AAA GAA TTA GCA GAC GCA AAA	368
Gly Gln Gly Met Met Asn Ala Ala Ala Lys Glu Leu Ala Asp Ala Lys	
55 60 65	
GCT GCT TTA ACT ACT TTG ATT AAT GGT GAA ACT GCA AAT CTT GCG TCA	416
Ala Ala Leu Thr Thr Leu Ile Asn Gly Glu Thr Ala Asn Leu Ala Ser	
70 75 80	
TAT GAA GAC TAT GCT AAG ATC AAA AGT GAA TTA ACA TCA GCG TAT GAA	464
Tyr Glu Asp Tyr Ala Lys Ile Lys Ser Glu Leu Thr Ser Ala Tyr Glu	
85 90 95	
ACA GCT AAA GCA GTT TCA GCT AAA ACT GGT GCA ACT CTA ATT GAG GTT	512
Thr Ala Lys Ala Val Ser Ala Lys Thr Gly Ala Thr Leu Asn Glu Val	
100 105 110	

AAT GAG GCA AAA ACT ACA TTA GAT GCT GCT ATT AAA AAA GCT GCT ACT	560
Asn Glu Ala Lys Thr Thr Leu Asp Ala Ala Ile Lys Lys Ala Ala Ser	
115 120 125 130	
GCT AAG AAT GAT TTT GAT GCA CAG CAC GGG TCA CTA GTG GAA GCA TAT	608
Ala Lys Asn Asp Phe Asp Ala Gln His Gly Ser Leu Val Glu Ala Tyr	
135 140 145	
AAC AAT CTA AAA GAA ACG TTA AAA GAA GAA AAA ACT AAT TTA GAT TCT	656
Asn Asn Leu Lys Glu Thr Leu Lys Glu Glu Lys Thr Asn Leu Asp Ser	
150 155 160	
CTT GCA AAC GAA AAT TAT GCA GCA ATC AGA ACT AAT CTT AAT AGT TTA	704
Leu Ala Asn Glu Asn Tyr Ala Ala Ile Arg Thr Asn Leu Asn Ser Leu	
165 170 175	
TAT GAA AAA GCC AAT ACT ATT GTT ACA GCT ACT TTA GAC CCT GCT ACT	752
Tyr Glu Lys Ala Asn Thr Ile Val Thr Ala Thr Leu Asp Pro Ala Thr	
180 185 190	
GGA AAT ATT CCT GAA GTT ATG AGT GTA ACA CAA GCT AAT CAA GAT ATT	800
Gly Asn Ile Pro Glu Val Met Ser Val Thr Gln Ala Asn Gln Asp Ile	
195 200 205 210	
ACT AAT GCA ACT TCA AGA CTA ATA GCT TGA AAA CAA AAT GCT GAT AAT	848
Thr Asn Ala Thr Ser Arg Leu Ile Ala Trp Lys Gln Asn Ala Asp Asn	
215 220 225	
TTA GCT AAC AGT TTT ATC AAA CAG TCT TTA GTT AAA AAT AAT TTG ACT	896
Leu Ala Asn Ser Phe Ile Lys Gln Ser Leu Val Lys Asn Asn Leu Thr	
230 235 240	
AGA GTT GAT GTA GCA AAT AAT CAG GAG CAA CCA GCA AAT TAC ACT TTT	944
Arg Val Asp Val Ala Asn Asn Gln Glu Gln Pro Ala Asn Tyr Ser Phe	
245 250 255	
GTT GGT TTT AGT GTT AAT GTT GAT ACT CCT AAC TGA AAT TTT GCG CAA	992
Val Gly Phe Ser Val Asn Val Asp Thr Pro Asn Trp Asn Phe Ala Gln	
260 265 270	

AGA AAA GTT TGG GCC TCT GAA AAT ACT CCT TTA GCA ACT ACA CCA GCT			1040
Arg Lys Val Trp Ala Ser Glu Asn Thr Pro Leu Ala Thr Thr Pro Ala			
275	280	285	290
GAA GAT GCA ACA CAA CAA GCT GCA TCC TTA ACA GAT GTT TCA TCA ATC			1088
Glu Asp Ala Thr Gln Gln Ala Ala Ser Leu Thr Asp Val Ser Trp Ile			
295	300	305	
TAT AGT TTA AAT GGT GCT GAA GCT AAA TAC ACA TTA ACC TTT CCT TAC			1136
Tyr Ser Leu Asn Gly Ala Glu Ala Lys Tyr Thr Leu Ser Phe Arg Tyr			
310	315	320	
TTT GGA CCT GAA AAA ACA GCT TAC TTA TAT TTC CCT TAT AAA TTA GTT			1184
Phe Gly Ala Glu Lys Thr Ala Tyr Leu Tyr Phe Pro Tyr Lys Leu Val			
325	330	335	
AAA ACT AGT GAT AAT GTT GGT TTA CAA TAT AAG TTA AAT GGT GGT GAT			1232
Lys Thr Ser Asp Asn Val Gly Leu Gln Tyr Lys Leu Asn Gly Gly Asp			
340	345	350	
ACT AAA CAA ATT AAC TTT GTC CAA ACT CCA GCT TCT GGT TCA AGT GAT			1280
Thr Lys Gln Ile Asn Phe Val Gln Thr Pro Ala Ser Gly Ser Ser Asp			
355	360	365	370
GTT GCT GCT AAT GAA GAA GAA ACT ATG GCT AGT CCT GCT GAA ATG CAG			1328
Val Ala Ala Asn Glu Glu Glu Thr Met Ala Ser Pro Ala Glu Met Gln			
375	380	385	
TCA GCA CCA ACT GTT Asp Asp Ile Lys Ile Ala Lys Val Ala Leu Ser			1376
Ser Ala Pro Thr Val GAC GAT ATT AAG ATT GCT AAA GTC GCT TTA TCT			
390	395	400	
AAT CTA AAA TTC AAT TCA AAC ACA ATT GAA TTT AGT GTC CCT ACA GGT			1424
Asn Leu Lys Phe Asn Ser Asn Thr Ile Glu Phe Ser Val Pro Thr Gly			
405	410	415	
AAA GCA GCT CCT ATG ATT GGA AAT ATG TAT TTA ACT TCA TCT AAT TCG			1472
Lys Ala Ala Pro Met Ile Gly Asn Met Tyr Leu Thr Ser Ser Asn Ser			
420	425	430	

CA	GTT	AAT	AAA	AAC	AAA	ATT	TAT	GAT	GAT	CTA	TTC	GGC	AAC	AGC	TTT	1520
Glu Val Asn Lys Asn Lys Ile Tyr Asp Asp Leu Phe Gly Asn Ser Phe																
435			440			445			450							
ATT	AAT	GAA	AAT	AAT	CGA	ACC	GCG	GTT	ACT	GTT	GAC	CTA	TTA	AAA	GGT	1568
Asn Asn Glu Asn Asn Pro Thr Ala Val Thr Val Asp Leu Leu Lys Gly																
		455				460			465							
TAT	ACT	CTT	GCT	GCT	AGT	TAC	AGT	ATA	TAT	GTT	CGC	CAA	TTC	AAT	GAT	1616
Tyr Ser Leu Ala Ala Scr Tyr Scr Ile Tyr Val Arg Gln Phe Asn Asp																
		470				475			480							
TTA	AAT	ATT	CAA	AAT	GGC	ACT	GAT	ATG	GCA	AGA	TCT	CGA	ACA	GTA	TAC	1664
Leu Asn Ile Gln Asn Gly Thr Asp Met Ala Arg Ser Arg Thr Val Tyr																
		485				490			495							
TTA	GTT	GGG	TTA	ATT	GGT	ACT	AAT	GCA	AGT	AGA	TCA	ATT	AGG	AAC	CTA	1712
Leu Val Gly Leu Ile Gly Ser Asn Ala Scr Arg Ser Ile Arg Asn Leu																
		500				505			510							
TCA	AAT	GTA	AGA	ACT	TCT	CCT	AAC	ACG	GTT	AGT	ACC	AAT	AGA	ACA	TTT	1760
Ser Asn Val Arg Thr Ser Pro Asn Thr Val Ser Thr Asn Arg Thr Phe																
		515				520			525			530				
ACA	ATA	TAT	GTA	AAT	GCT	CCA	AAG	TCA	GGT	GAT	TAT	TAT	CTA	AGT	GGT	1808
Thr Ile Tyr Val Asn Ala Pro Lys Ser Gly Asp Tyr Tyr Leu Ser Gly																
		535				540			545							
TCG	TAT	CTT	ACA	AAT	CAA	AAT	AGA	AAT	ATT	AAA	TTC	TTA	AAT	AGC	AGC	1856
Ser Tyr Leu Thr Asn Gln Asn Arg Asn Ile Lys Phe Leu Asn Ser Ser																
		550				555			560							
TCT	GAT	CAG	ACT	AGT	AAT	TCT	CTA	ACA	CTA	AAT	GTT	AAG	GCT	CAA		1904
Ser Asp Gln Thr Ser Ser Asn Ser Leu Thr Leu Asn Val Lys Ala Gln																
		565				570			575							
ACA	AAT	TGA	GAG	ACT	TTA	GGA	AAT	TTC	GAT	ACA	TCT	AAT	AAT	ACG	AAT	1952
Thr Asn Trp Glu Thr Leu Gly Asn Phe Asp Thr Ser Asn Asn Thr Asn																
		580				585			590							

ATT CTT ACT AAT AGT GGA TCA AGC ACA ACA ACA GGC CCG ACT TTA AAT	2000
Ile Val Thr Asn Ser Gly Ser Ser Thr Thr Thr Gly Arg Thr Leu Asn	
595 600 605 610	
TTA AAA CAA GGA TTA AAC AAA ATT GTT ATC AGT GGA GTA GGT AAT GGT	2048
Leu Lys Gln Gly Leu Asn Lys Ile Val Ile Ser Gly Val Gly Asn Gly	
615 620 625	
AAT ACT CCT TTC ATA GGT AAC TTA ACA TTT ACT TTG ATG GAT AAA ACA	2096
Asn Thr Pro Phe Ile Gly Asn Leu Thr Phe Thr Leu Met Asp Lys Thr	
630 635 640	
GCT AGT CCT GTA GTT GAT GAC ACT ATT TTA GAA GGA TCT ATA GAA GCT	2144
Ala Ser Pro Val Val Asp Asp Thr Ile Leu Glu Gly Ser Ile Glu Ala	
645 650 655	
GCT TCA AAA TAA AAAATTATGT TTTTTAAAT CTTTTCAA GGATCATGTT	2196
Gly Ser Lys ***	
660	
TCTGTTAAA CGCTAAGTTA GTTAGATAAT AAAATAAAAG TTATTTGTTT TACTCCATGT	2256
AATATGGCAT GAAATCTGAA TCAAACCTCA GATTTCATGT TTTTTTATT AAGGAAGCAA	2316
ATATGAGATA CTAGCAGCCT TTTGTCTACT ATACTTATGA TCGAACTAGA TCT	2369

(2) 配列番号 2 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 48
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 1 本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A
- (xi) 配列の表示: 配列番号 2

CATCTTCCAT TTTAGGATCT ATATTATTT TTCAACGATC CGAGCTCG

(2) 配列番号 3 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 48
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 1 本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A
- (xi) 配列の表示: 配列番号 3

GATCTTCCAT TTTAGGATCT ATATTATTTT TTCAACGATC CGAGCTCG

48

(2) 配列番号 4 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 55
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 1 本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A
- (xi) 配列の表示: 配列番号 4

AGCTTTTTTT TTTTTTTTTT TTTGGCATAT AAATAATAAA TACAATAATT AATTA 55

(2) 配列番号 5 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 55
- (B) 配列の型: 核酸

(C) 鎖の数 : 1 本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A
 (xi) 配列の表示: 配列番号 5

CGCGTAATTA ATTATTGTAT TTATTATTTA TATGCCAAAA AAAAAAAA AAAAAA 55

(2) 配列番号 6 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 40
 (B) 配列の型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 1 本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A
 (xi) 配列の表示: 配列番号 6

CGCGTAAAAA TTGAAAAACT ATTCTAATT ATTGCAC TCG 40

(2) 配列番号 7 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 40
 (B) 配列の型 : 核酸
 (C) 鎖の数 : 1 本鎖
 (D) トポロジー: 直鎖状
 (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A
 (xi) 配列の表示: 配列番号 7

GATCCGAGTG CAATAAATTA GAATAGTTT TCAATTTTA 40

(2) 配列番号 8 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 42
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 1 本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A
- (xi) 配列の表示: 配列番号 8

GATCCCCGGG CGAGCTCGCT AGCGGGCCCCG CATGCGGTAC CG 42

(2) 配列番号 9 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 42
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 1 本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A
- (xi) 配列の表示: 配列番号 9

TCGACGGATC CGCATGCGGG CCCGCTAGCG AGCTCGCCCCG GG 42

(2) 配列番号 10 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 39

- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A
- (xi) 配列の表示: 配列番号 1 0

TCGACCCGGT ACATTTTAT AAAAATGTAC CCGGGGATC

39

(2) 配列番号 1 1 についての情報

- (i) 配列の特性
- (A) 配列の長さ: 35
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A
- (xi) 配列の表示: 配列番号 1 1

GATCCCCGGG TACATTTTA TAAAAATGTA CCGGG

35

(2) 配列番号 1 2 についての情報

- (i) 配列の特性
- (A) 配列の長さ: 14
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 1 本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A
- (xi) 配列の表示: 配列番号 1 2

ATTTTTATAAA AAAT

14

(2) 配列番号 1 3 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 66
- (B) 配列の型: アミノ酸
- (C) 鎮の数: 一本鎮
- (D) トポロジー: 直鎮状
- (E) 配列の種類: DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 1 3

ATC GCG ATC CTA CTT TTA ACA GTA GTG ACC TTA GCC ATC TCT GCA GCC

48

Ile Ala Ile Leu Leu Leu Thr Val Val Thr Leu Ala Ile Ser Ala Ala

5

10

15

GCC CTT GCA TAT AGT ATG

66

Ala Leu Ala Tyr Ser Met

20

(2) 配列番号 1 4 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 1387
- (B) 配列の型: アミノ酸
- (C) 鎮の数: 二本鎮
- (D) トポロジー: 直鎮状
- (E) 配列の種類: DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 1 4

AAAAACATCA GATTGTTAAT CTGATATCTT TGCTTAAAAA AACACAAAAT CTTCTAACAA	60		
AATCCTAAAT AAATAAGCCG TTAAATTAAAC TAAAAAATTA AAAAAATGGT TTTTCTTATC	120		
AACCAAAATT CTCTAGTAAT AAACGCTTAT TTATTTTAT TTTAGTCAT CTTTTAAGAT	180		
ATAAAATATAT CTTAATATTC T ATG AAT AAG AAA AGA ATC ATC TTA AAG ACT	231		
Met Asn Lys Lys Arg Ile Ile Leu Lys Thr			
5	10		
ATT AGT TTG TTA GGT ACA ACA TCC TTT CTT AGC ATT GGG ATT TCT AGC	279		
Ile Ser Leu Leu Gly Thr Thr Ser Phe Leu Ser Ile Gly Ile Ser Ser			
15	20	25	
TGT ATG TCT ATT ACT AAA AAA GAC GCA AAC CCA AAT AAT GGC CAA ACC	375		
Cys Met Ser Ile Thr Lys Lys Asp Ala Asn Pro Asn Asn Gly Gln Thr			
30	35	40	
CAA TTA CAA GCA GCG CGA ATG GAG TTA ACT GAT CTA ATC AAT GCT AAA	327		
Gln Leu Gln Ala Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Ala Lys			
45	50	55	
GCA AGG ACA TTA GCT TCA CTA CAA GAC TAT GCT AAG ATT GAA GCT AGT	423		
Ala Arg Thr Leu Ala Ser Leu Gln Asp Tyr Ala Lys Ile Glu Ala Ser			
60	65	70	
TTA TCA TCT GCT TAT AGT GAA CCT GAA ACA GTT AAC AAT AAC CTT AAT	471		
Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Ala Glu Thr Val Asn Asn Asn Leu Asn			
75	80	85	90
GCA ACA CTA GAA CAA CTA AAA ATG GCT AAA ACT AAT TTA GAA TCA GCC	519		
Ala Thr Leu Glu Gln Leu Lys Met Ala Lys Thr Asn Leu Glu Ser Ala			
95	100	105	
ATC AAC CAA CCT AAT ACG GAT AAA ACG ACT TTT GAT AAT GAA CAT CCA	567		
Ile Asn Gln Ala Asn Thr Asp Lys Thr Thr Phe Asp Asn Glu His Pro			
110	115	120	

AAT TTA GTT GAA GCA TAC AAA GCA CTA AAA ACC ACT TTA GAA CAA CGT	615		
Asn Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr Thr Leu Glu Gln Arg			
125	130	135	
GCT ACT AAC CTT GAA CGT TTA GCT TCA ACT GCT TAT AAT CAG ATT CGT	663		
Ala Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Ile Arg			
140	145	150	
AAT AAT TTA GTG GAT CTA TAC AAT AAT GCT AGT AGT TTA ATA ACT AAA	711		
Asn Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Asn Ala Ser Ser Leu Ile Thr Lys			
155	160	165	170
ACA CTA GAT CCA CTA AAT CGG CGA ATG CTT TTA GAT TCT AAT GAG ATT	759		
Thr Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Met Leu Leu Asp Ser Asn Glu Ile			
175	180	185	
ACT ACA GTT AAT CGG AAT ATT AAT AAT ACG TTA TCA ACT ATT AAT GAA	807		
Thr Thr Val Asn Arg Asn Ile Asn Asn Thr Leu Ser Thr Ile Asn Glu			
190	195	200	
CAA AAG ACT AAT GCT GAT GCA TTA TCT AAT AGT TTT ATT AAA AAA GTG	855		
Gln Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser Phe Ile Lys Lys Val			
205	210	215	
ATT CAA AAT AAT GAA CAA ACT TTT GTA GGG ACT TTT ACA AAC GCT AAT	903		
Ile Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr Phe Thr Asn Ala Asn			
220	225	230	
GTT CAA CCT TCA AAC TAC ACT TTT GTT GCT TTT AGT GCT GAT GTA ACA	951		
Val Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe Ser Ala Asp Val Thr			
235	240	245	250
CCC GTC AAT TAT AAA TAT GCA AGA AGG ACC GTT NNN AAT GGT GAT GAA	999		
Pro Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val Xaa Asn Gly Asp Glu			
255	260	265	

AAT TTA GTT GAA GCA TAC AAA GCA CTA AAA ACC ACT TTA GAA CAA CCT	615		
Asn Leu Val Glu Ala Tyr Lys Ala Leu Lys Thr Thr Leu Glu Gln Arg			
125	130	135	
GCT ACT AAC CTT GAA GGT TTA GCT TCA ACT GCT TAT AAT CAG ATT CGT	663		
Ala Thr Asn Leu Glu Gly Leu Ala Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Ile Arg			
140	145	150	
AAT AAT TTA GTG GAT CTA TAC AAT AAT GCT AGT AGT TTA ATA ACT AAA	711		
Asn Asn Leu Val Asp Leu Tyr Asn Asn Ala Ser Ser Leu Ile Thr Lys			
155	160	165	170
ACA CTA GAT CCA CTA AAT GGG GGA ATG CTT TTA GAT TCT AAT GAG ATT	759		
Thr Leu Asp Pro Leu Asn Gly Gly Met Leu Leu Asp Ser Asn Glu Ile			
175	180	185	
ACT ACA GTT AAT CGG AAT ATT AAT AAT ACG TTA TCA ACT ATT AAT GAA	807		
Thr Thr Val Asn Arg Asn Ile Asn Asn Thr Leu Ser Thr Ile Asn Glu			
190	195	200	
CAA AAG ACT AAT GCT GAT GCA TTA TCT AAT AGT TTT ATT AAA AAA GTG	855		
Gln Lys Thr Asn Ala Asp Ala Leu Ser Asn Ser Phe Ile Lys Lys Val			
205	210	215	
ATT CAA AAT AAT GAA CAA AGT TTT GTA GGG ACT TTT ACA AAC GCT AAT	903		
Ile Gln Asn Asn Glu Gln Ser Phe Val Gly Thr Phe Thr Asn Ala Asn			
220	225	230	
GTT CAA CCT TCA AAC TAC AGT TTT GTT GCT TTT AGT GCT GAT GTA ACA	951		
Val Gln Pro Ser Asn Tyr Ser Phe Val Ala Phe Ser Ala Asp Val Thr			
235	240	245	250
CCC GTC ATT TAT AAA TAT GCA AGA AGG ACC GTT NNN AAT GGT GAT GAA	999		
Pro Val Asn Tyr Lys Tyr Ala Arg Arg Thr Val Xaa Asn Gly Asp Glu			
255	260	265	

CCT TCA ACT AGA ATT CTT GCA AAC ACG AAT AGT ATC ACA GAT GTT TCT	1047		
Pro Ser Ser Arg Ile Leu Ala Asn Thr Asn Ser Ile Thr Asp Val Ser			
270	275	280	
Xaa ATT TAT AGT TTA CCT GGA ACA AAC ACG AAC TAC CAA TTT ACT TTT	1095		
NNN Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys Tyr Gln Phe Ser Phe			
285	290	295	
ACC AAC TAT GGT CCA TCA ACT GGT TAT TTA TAT TTC CCT TAT AAG TTG	1143		
Ser Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr Phe Pro Tyr Lys Leu			
300	305	310	
GTT AAA GCA GCT GAT GCT AAT AAC GTT GGA TTA CAA TAC AAA TTA AAT	1191		
Val Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu Gln Tyr Lys Leu Asn			
315	320	325	330
AAT GGA AAT GTT CAA CAA GTT GAG TTT GCC ACT TCA ACT AGT GCA AAT	1239		
Asn Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr Ser Thr Ser Ala Asn			
335	340	345	
AAT ACT ACA GCT AAT CCA ACT CAG CAG TTG ATG AGA TTA AAG TTG CTA	1287		
Asn Thr Ala Asn Pro Thr Gln Gln Leu Met Arg Leu Lys Leu Leu			
350	355	360	
AAA TCG TTT TAT CAG GTT TAA GATTTGGCCA AAMCACAATC GAATTAAGTG	1338		
Lys Ser Phe Tyr Gln Val ***			
365			
TTCCAACGGG TGAAGGAAAT ATGAATAAAG TTGGCCCAAT GATTGGCAA	1387		

(2) 配列番号 15 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ: 1945

(B) 配列の型: アミノ酸

(C) 鎖の数 : 二本鎖

(D) トポロジー: 直鎖状

(E) 配列の種類: D N A

(xi) 配列の表示: 配列番号 1 5

CGTACGTTTT AATGGCTATT GGGCTCTTAT TTTATTGTCA GGATTGCAC TAACACCAAGT	60
ATAGCAAGC CCAATTAAC TACAGAGT TACAGAG ATG ATG AAT GGT CAA GAA	114
Met Met Asn Gly Gln Glu	
5	
GTC ACA ACA ACT AAA AAG ATT AGT ACG TTT GGC TTC TTA ATC AAC ATG	162
Val Thr Thr Thr Lys Lys Ile Ser Thr Phe Ala Phe Leu Ile Asn Met	
1 0 1 5 2 0	
TTA CCA AAT TAC CAA CTA AGT ACA CTT GGT TAC TTA CAG ATT ACA GCA	210
Leu Pro Asn Tyr Gln Leu Ser Thr Leu Gly Tyr Leu Gln Ile Thr Ala	
2 5 3 0 3 5	
GCT GCT GCT GGA CTT GTC GTC GGG ATT GTC TTA CTT GCA TTA GGC GCA	258
Ala Ala Ala Gly Leu Val Val Gly Ile Val Leu Leu Ala Leu Gly Ala	
4 0 4 5 5 0	
ACA TTC TTT GTT AAA ACT AGA CGT AAA ACA AAT GAA ATG CTT GCT GCA	306
Thr Phe Phe Val Lys Thr Arg Arg Lys Thr Asn Glu Met Leu Ala Ala	
5 5 6 0 6 5 7 0	
CTT CAA GAT GCT GAA GAA GAA GTG GCA CAA GAA GAA CAA GCT GAA	354
Leu Gln Asp Ala Glu Glu Glu Val Ala Gln Glu Gln Ala Glu	
7 5 8 0 8 5	
GAA AAT GTT GAA GTC ACT CCA ACT CAA CAA GCT GAA GTT AAG ACT GAA	402
Glu Asn Val Glu Val Thr Pro Thr Gln Gln Ala Glu Val Lys Thr Glu	
9 0 9 5 1 0 0	
CAA TTA ATT GGC ACA CAA TTA GTC ACA ACT GAT GTC GCT AGC AAT CAA	450
Gln Leu Ile Gly Thr Gln Leu Val Thr Thr Asp Val Ala Ser Asn Gln	
1 0 5 1 1 0 1 1 5	
GCT GCA GGT ACT GAA CAA GTT GAA GGT GAT TTA TTA CCT CCT ACT CAA	498
Ala Ala Gly Thr Glu Gln Val Glu Gly Asp Leu Leu Pro Pro Ser Gln	
1 2 0 1 2 5 1 3 0	

CAA CCA ACG GAA ATG CGT CCA GCT CCT TCA CCA ATG GGT AGT CCT AAG	546
Gln Pro Thr Glu Met Arg Pro Ala Pro Ser Pro Met Gly Ser Pro Lys	
135 140 145 150	
TTA TTA GGT CCA AAC CAA GCT GGT CAT CCA CAA CAC GGA CCA CGT CCG	594
Leu Leu Gly Pro Asn Gln Ala Gly His Pro Gln His Gly Pro Arg Pro	
155 160 165	
ATG AAT GCT CAT CCA GGT CAA CCA CGT CCT CAA CAA GCT GCC CCA CGT	642
Met Asn Ala His Pro Gly Gln Pro Arg Pro Gln Gln Ala Gly Pro Arg	
170 175 180	
CCA ATG GGA GCT GGT GGA TCT AAC CAA CCA AGA CCC ATG CCA AAT GGT	690
Pro Met Gly Ala Gly Ser Asn Gln Pro Arg Pro Met Pro Asn Gly	
185 190 195	
CCA CAA AAC CAA CAA GGT CCA AGA CCA ATG AAC CCT CAA GGC AAT CCT	738
Pro Gln Asn Gln Gln Gly Pro Arg Pro Met Asn Pro Gln Gly Asn Pro	
200 205 210	
CGT CCT GGA CCA CCT GCC CCA CGA CCT AAC GGC CCA CAA AAT TCT CAA	786
Arg Pro Gly Pro Ala Gly Pro Arg Pro Asn Gly Pro Gln Asn Ser Gln	
215 220 225 230	
CCA CGT CCT CAA CCA GCT GCC CCA CGT CCA ATG GGA GCT GGT AGA TCT	834
Pro Arg Pro Gln Pro Ala Gly Pro Arg Pro Met Gly Ala Gly Arg Ser	
235 240 245	
AGC CAA CCA AGA CCA ATG CCA AAT GGT CCA CAA AAC CAA GGT CCA	882
Asn Gln Pro Arg Pro Met Pro Asn Gly Pro Gln Asn Gln Gln Gly Pro	
250 255 260	
AGA CCA ATG AAC CCT CAA GCC AAT CCT CGT CCT CAA CCA GCT GGT GTC	930
Arg Pro Met Asn Pro Gln Gly Asn Pro Arg Pro Gln Pro Ala Gly Val	
265 270 275	
AGA CCT AAC AGC CCA CAA GCT AAC CAG CCA GGA CCA CGT CCA ACG CCA	978
Arg Pro Asn Ser Pro Gln Ala Asn Gln Pro Gly Pro Arg Pro Thr Pro	
280 285 290	

AAT AAT CCT CAA GCA CCA CGG CCA ATG CCT CCA AGA CCA AAT GGA GGA	1026
Asn Asn Pro Gln Gly Pro Arg Pro Met Gly Pro Arg Pro Asn Gly Gly	
295 300 305 310	
CCA AAC CGA GCT TAATTAACCA ATAGATTAGC TCTAATTTG AAAACAGTTC	1078
Pro Asn Arg Ala	
ATTTCTAGA AAATGAAC TG TTTTTTTAT TATTTGTAAG TAAATTTATT AATCAACCGC	1138
TTGTTTTGTT GAATAAAGAT AGATCACAAC ATCTTCTTGA TTTACATCTT TAATTGCGAT	1198
ATTATTGATC ATTAAGGGGA TCTTGATGAT CTGATACATC TTGTTATTCT CATAATCAAG	1258
ATAATTAAGA TCTGAAGCAC TAAAAGCAAA TAGCTCTTGT TCAGATTGGA TTAGTTCTT	1318
AGCATTATTT AAGAACGACT GATCATCACT CACTAATAAT AAGATCTGAT TCAAGTTTT	1378
GATATCAGTT GCTACTTCTT GATTTAACAT CAATGTTCA TAGCGTGATA ATAAGGATT	1438
AAAACGGTGA ATGATTGATG TCGTTGCACT TTTCTCATCG TTGGTTCAA CGTATTGAAA	1498
AGTGTTCATT AAGTTAATGT ATTCTTGCTG GTATTTCTTA TTAATCTGAT CAGGGTTATC	1558
TGAATAGATT AAGATGTTCT TATTAGTTTG ATCAACAATA ACCATCGTTG CTITCATTAA	1618
AGCTCAGTAA GTAAATAGTT TTTCAATCTT ATGCTTTAAT AAAAACGGGA TGATATTCTT	1678
ATGTTAGGTTA AACTTATTAA AAATAACTTT TGCAATCTGG TTGACTAGTT TATGATCAAC	1738
CTGGTTGATA GTTAATTCT TAACCATAAG AAGATTTAA AATATTTAAA AAAACTATTG	1798
CTGATATGTT AAAATAGTTA AGGTATAAAA ATAATAAATT AAATATGGCT CGTAGAGATG	1858
ATCTAACCGG GCTTGGTCCT TTAGCAGGAA ATAATCGTTTC TCATGCTTTAACATTACCA	1918
ACCGCTCGTTG AAACTTAAAC CTACAAA	1945

(2) 配列番号 1 6 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ : 1935

(B) 配列の型 : アミノ酸

(D) トポロジー : 直鎖状

(E) 配列の種類: D N A

(xi) 配列の表示: 配列番号 1 6

TTTATTTTA TTTTGGTAA ATCTTTAAA ATATAAAATAT ATTTTAATAT TCT ATG	56
Met	
AAT AAA AAA AGA ATC ATC TTA AAG ACT ATT AGC TTG TTA GGT ACA ACA	104
Asn Lys Lys Arg Ile Ile Leu Lys Thr Ile Ser Leu Leu Gly Thr Thr	
5 10 15	
TCC TTT CTT ACT ATT GGG ATT TCT AGC TGT ATG TCT ATT ACT AAA AAA	152
Ser Phe Leu Ser Ile Gly Ile Ser Ser Cys Met Ser Ile Thr Lys Lys	
20 25 30	
GAT GCA AAC CCA AAT AAT GGC CAA ACC CAA TTA GAA GCA GCG CGA ATG	200
Asp Ala Asn Pro Asn Asn Gly Gln Thr Gln Leu Glu Ala Ala Arg Met	
35 40 45	
GAG TTA ACA GAT CTA ATC AAT GCT AAA GCG ATG ACA TTA GCT TCA CTA	248
Glu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Ala Lys Ala Met Thr Leu Ala Ser Leu	
50 55 60 65	
CAA GAC TAT GCC AAG ATT GAA GCT AGT TTA TCA TCT GCT TAT AGT GAA	296
Gln Asp Tyr Ala Lys Ile Glu Ala Ser Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Glu	
70 75 80	
GCT GAA ACA GTT AAC AAT AAC CTT AAT GCA ACA TTA GAA CAA CTA AAA	344
Ala Glu Thr Val Asn Asn Leu Asn Ala Thr Leu Glu Gln Leu Lys	
85 90 95	
ATG GCT AAA ACT AAT TTA GAA TCA GCC ATC AAC CAA GCT AAT ACG GAT	392
Met Ala Lys Thr Asn Leu Glu Ser Ala Ile Asn Gln Ala Asn Thr Asp	
100 105 110	
AAA ACG ACT TTT GAT AAT GAA CAC CCA AAT TTA GTT GAA GCA TAC AAA	440
Lys Thr Thr Phe Asp Asn Glu His Pro Asn Leu Val Glu Ala Tyr Lys	
115 120 125	
GCA CTA AAA ACC ACT TTA GAA CAA CGT GCT ACT AAC CTT GAA GGT TTG	488

Ala Leu Lys Thr Thr Leu Glu Gln Arg Ala Thr Asn Leu Glu Gly Leu				
130	135	140	145	
TCA TCA ACT GCT TAT AAT CAA ATT CGC AAT AAT TTA GTC GAT CTA TAC				536
Ser Ser Thr Ala Tyr Asn Gln Ile Arg Asn Asn Leu Val Asp Leu Tyr				
150	155	160		
AAT AAA GCT AGT AGT TTA ATA ACT AAA ACA CTA GAT CCA CTA AAT GGG				584
Asn Lys Ala Ser Ser Leu Ile Thr Lys Thr Leu Asp Pro Leu Asn Gly				
165	170	175		
GGA ACG CTT TTA GAT TCT AAT GAG ATT ACT ACA GCT AAT AAG AAT ATT				632
Gly Thr Leu Leu Asp Ser Asn Glu Ile Thr Thr Ala Asn Lys Asn Ile				
180	185	190		
AAT AAT ACG TTA TCA ACT ATT AAT GAA CAA AAG ACT AAT GCT GAT GCA				680
Asn Asn Thr Leu Ser Thr Ile Asn Glu Gln Lys Thr Asn Ala Asp Ala				
195	200	205		
TTA GCT AAT AGT TTT ATT AAA GAA GTG ATT CAA AAT AAT AAA CAA AGT				728
Leu Ala Asn Ser Phe Ile Lys Glu Val Ile Gln Asn Asn Lys Gln Ser				
210	215	220	225	
TTT GCA GGA ATG TTT ACA AAC ACT AAT GTT CAA CCT TCA AAC TAT AGT				776
Phe Val Gly Met Phe Thr Asn Thr Asn Val Gln Pro Ser Asn Tyr Ser				
230	235	240		
TTT GTT GCT TTT AGT GCT GAT GCA ACA CCT GTT AAT TAT AAA TAT GCA				824
Phe Val Ala Phe Ser Ala Asp Val Thr Pro Val Asn Tyr Lys Tyr Ala				
245	250	255		
AGA AGA ACG GTT TGA ATT GGT GAT GAA CCT TCA AGT AGA ATT CTT GCA				872
Arg Arg Thr Val Trp Asn Gly Asp Glu Pro Ser Ser Arg Ile Leu Ala				
260	265	270		
AAC ACC AAT AGT ATT ACT GAT GTT TCA TGA ATT TAT AGT TTA TCT GGA				920
Asn Thr Asn Ser Ile Thr Asp Val Ser Trp Ile Tyr Ser Leu Ser Gly				
275	280	285		
ACA AAC ACG AAA TAC CAA TTT AGT TTT AGC AAC TAC GGT CCA TCA ACT				968

Thr Asn Thr Lys Tyr Gln Phe Ser Phe Ser Asn Tyr Gly Pro Ser Thr			
290	295	300	305
CGT TAT TTA TAT TTC CCT TAT AAG TTG GTT AAA GCG GCT GAT GCT ACT			1016
Gly Tyr Leu Tyr Phe Pro Tyr Lys Leu Val Lys Ala Ala Asp Ala Ser			
310	315	320	
AAT GTT GGA TTA CAA TAC AAA CTA AAT AAT GGA AAT GTT CAA CCA GTT			1064
Asn Val Gly Leu Gln Tyr Lys Leu Asn Asn Gly Asn Val Gln Pro Val			
325	330	335	
GAG TTT GCC ACT TCA ACT AGC GCA AAT AAT ACT ACA CCT AAT CCA ACT			1112
Glu Phe Ala Thr Ser Thr Ser Ala Asn Asn Thr Thr Ala Asn Pro Thr			
340	345	350	
CCA GCA GTT GAT GAG ATT AAA GTT GCT AAA ATC GTT TTA TCA GGT TTA			1160
Pro Ala Val Asp Glu Ile Lys Val Ala Lys Ile Val Leu Ser Gly Leu			
355	360	365	
AGA TTT GGC CAA AAC ACA ATC GAA TTA AGT GTT CCA ACG CCT GAA AGA			1208
Arg Phe Gly Gln Asn Thr Ile Glu Leu Ser Val Pro Thr Gly Glu Arg			
370	375	380	385
AAT ATG AAT AAA GTT GCC CCA ATG ATT GGT AAT ATG TAT ATT ACT TCA			1256
Asn Met Asn Lys Val Ala Pro Met Ile Gly Asn Met Tyr Ile Thr Ser			
390	395	400	
TCT AAT GCT GAA GCA AAT AAA AAG CAA ATT TAC GAT AGT ATT TTT GGA			1304
Ser Asn Ala Glu Ala Asn Lys Lys Gln Ile Tyr Asp Ser Ile Phe Gly			
405	410	415	
AAC ACT TCA TCA CAA ACT GCT AGC CAA ACA TCT GTT AGT GTT GAT CTA			1352
Asn Thr Ser Ser Gln Thr Ala Ser Gln Thr Ser Val Ser Val Asp Leu			
420	425	430	
TTA AAA GGA TAT AGT CTT GCA ACT AGT TCA AGA ACA TAT ATT CGT CAA			1400
Leu Lys Gly Tyr Ser Leu Ala Thr Ser Ser Arg Thr Tyr Ile Arg Gln			
435	440	445	
TTT ACT GGT TTA ACA GAT AAT GGC GTA CAA ACC TCT GAC CCA GTT TAT			1448

Phe Thr Gly Leu Thr Asp Asn Gly Val Gln Thr Ser Asp Pro Val Tyr
 450 455 460 465
 TTA ATT GGT TTG ATT GGT CGT CAG GAT CGT ACA GTT GCA ACT GGT 1496
 Leu Ile Gly Leu Ile Gly Gly Arg Gln Asp Arg Thr Val Ala Thr Gly
 470 475 480
 ACA ACC AAT ATT CAA AAT TCT CCT GAT GTC GAT AAT GAT AAT AGA ACA 1544
 Thr Thr Asn Ile Gln Asn Ser Pro Asp Val Asp Asn Asn Arg Thr
 485 490 495
 TTC ACA ATA TAT GTC AAT GCA CCA ATA AAC GGG AAC TAT CAC ATA AGT 1592
 Phe Thr Ile Tyr Val Asn Ala Pro Ile Asn Gly Asn Tyr His Ile Ser
 500 505 510
 GGT GCG TAT TTA CAA CGA ACG CGT ACA GCA AGA AGT CTG AAA TTC TCA 1640
 Gly Ala Tyr Leu Gln Gly Thr Arg Thr Ala Arg Ser Leu Lys Phe Ser
 515 520 525
 TCC GGT ACA AGT GGC AGT AAT AAT GAA GTT ACA GTC CTT GGT TTA GAA 1688
 Ser Gly Thr Ser Gly Ser Asn Asn Glu Val Thr Val Leu Gly Leu Glu
 530 535 540 545
 CAA AGG GAT TGA ACA ATA TTA GGT CAC TTT GAT ACA AAG ATG GAT GGT 1736
 Gln Arg Asp Trp Thr Ile Leu Gly His Phe Asp Thr Lys Met Asp Gly
 550 555 560
 ACT ACT ACT ATT TCA TGA ACA AAT ACA GCA ACC AAA AGA ACT CTA ACC 1784
 Thr Thr Thr Ile Ser Trp Thr Asn Thr Ala Ser Lys Arg Thr Leu Thr
 565 570 575
 TTA AAT AAA GGT CTA ATT AAA ATT ATT CTA AGT GGA GGA ACT CAA GAT 1832
 Leu Asn Lys Gly Leu Asn Lys Ile Ile Val Ser Gly Gly Thr Gln Asp
 580 585 590
 AAC ACA AAT GCT CCA TTT ATC GGT AAC TTA ACA TTT ACT CTC CAT CTA 1880
 Asn Thr Asn Ala Pro Phe Ile Gly Asn Leu Thr Phe Thr Leu His Leu
 595 600 605
 ACG TAGAAACTTC TATTGCAAGC TCTCAATCTG CACAACCGT TAAAAATAGA TG 1935
 Thr
 610

(2) 配列番号 1 7 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 32
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示:

TACGTTCTTCCTGGCAAACCTTACCACTACTT

32

(2) 配列番号 1 8 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 21
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示:

CTACAAAGAACCTAAATATCA

21

(2) 配列番号 1 9 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 24
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(E) 配列の種類：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示：

TATAGAATTAAATTACTTATTTC

24

(2) 配列番号20についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ：97

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(E) 配列の種類：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示：

AGCTTTTTTT TTTTTTTTT TTTGGCATAT AAATAATAAA TACAATAATT AATTACGCGT 60

AAAAATTGAA AAACTATTCT AATTTATTGC ACTCGTC

97

(2) 配列番号21についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ：93

(B) 配列の型：核酸

(C) 鎖の数：一本鎖

(D) トポロジー：直鎖状

(E) 配列の種類：他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示：

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAC CGTATATTTA TTATTTATGT TATTAATTAA TGCGCATT 60
 TAACTTTTG ATAAGATTAA ATAACGTGAG CAG 93

(2) 配列番号 2 2 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 95
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A

(xi) 配列の表示:

AGCTTTTTTT TTTTTTTTT TTTGGCATAT AAATAATAAA TACAATAATT AATTACGCGT 60
 AAAAATTGAA AAACTATTCT AATTATTGC ACTCG 95

(2) 配列番号 2 3 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 96
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A

(xi) 配列の表示:

AAAAAAAAAA AAAAAAAAAC CCGTATATTT ATTATTTATG TTATTAATTAA ATGCGCATT 60
 TAACTTTTG GATAAGATTAA AATAACGTGA GCCTAG 96

(2) 配列番号 2 4 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 11
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A

(xi) 配列の表示:

GATCCAGCATG

11

(2) 配列番号 2 5 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 10
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成 D N A

(xi) 配列の表示:

GTCGTACCTG

10

(2) 配列番号 2 6 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 21
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(E) 配列の種類： 他の核酸 合成 D N A

(xi) 配列の表示：

GGGATTTCGAATTCTATGTCT

21

(2) 配列番号 27 についての情報

(i) 配列の特性

(A) 配列の長さ： 2346

(B) 配列の型： アミノ酸

(C) 鎖の数： 二本鎖

(D) トポロジー： 直鎖状

(E) 配列の種類： D N A

(xi) 配列の表示： 配列番号 27

AAAAACATCA GATTGTTAAT CTGATATCTT TGCTTAAAAA AACACAAAAT CTTCTAACAA	60		
AATCCTAAAT AAATAAGCCG TTAAATTAAC TAAAAAATTA AAAAAATGCT TTTTCTTATC	120		
AACCAAAATT CTCTAGTAAT AAACGCTTAT TTATTTTAT TTTAGTCAT CTTTTAAGAT	180		
ATAAATATAT CTTAATATTC T ATG AAT AAG AAA AGA ATC ATC TTA AAG ACT	231		
Met Asn Lys Lys Arg Ile Ile Leu Lys Thr			
5	10		
ATT ACT TTG TTA GGT ACA ACA TCC TTT CTT ACC ATT GGG ATT TCT AGC	279		
Ile Ser Leu Leu Gly Thr Thr Ser Phe Leu Ser Ile Gly Ile Ser Ser			
15	20	25	
TGT ATG TCT ATT ACT AAA AAA GAC GCA AAC CCA AAT AAT GCC CAA ACC	327		
Cys Met Ser Ile Thr Lys Lys Asp Ala Asn Pro Asn Asn Gly Gln Thr			
30	35	40	
CAA TTA CAA GCA GCG CGA ATG GAG TTA ACT GAT CTA ATC AAT GCT AAA	375		
Gln Leu Gln Ala Ala Arg Met Glu Leu Thr Asp Leu Ile Asn Ala Lys			
45	50	55	
GCA AGG ACA TTA GCT TCA CTA CAA GAC TAT GCT AAG ATT GAA GCT AGT	423		
Ala Arg Thr Leu Ala Ser Leu Gln Asp Tyr Ala Lys Ile Glu Ala Ser			
60	65	70	
TTA TCA TCT TAT ACT GAA GCT GAA ACA GTT AAC AAT AAC CTT AAT	471		
Leu Ser Ser Ala Tyr Ser Glu Ala Glu Thr Val Asn Asn Asn Leu Asn			
75	80	85	90
GCA ACA CTA GAA CAA CTA AAA ATG GCT AAA ACT AAT TTA GAA TCA GCC	519		
Ala Thr Leu Glu Gln Leu Lys Met Ala Lys Thr Asn Leu Glu Ser Ala			
95	100	105	
ATC AAC CAA GCT AAT ACG GAT AAA ACG ACT TTT GAT AAT GAA CAT CCA	567		
Ile Asn Gln Ala Asn Thr Asp Lys Thr Thr Phe Asp Asn Glu His Pro			
110	115	120	
AAT TTA GTT GAA GCA TAC AAA GCA CTA AAA ACC ACT TTA GAA CAA CGT	615		

Asn	Leu	Val	Glu	Ala	Tyr	Lys	Ala	Leu	Lys	Thr	Thr	Leu	Glu	Gln	Arg
125															
GCT	ACT	AAC	CTT	CAA	GCT	TTA	GCT	TCA	ACT	GCT	TAT	AAT	CAG	ATT	CGT
Ala	Thr	Asn	Leu	Glu	Gly	Leu	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr	Asn	Gln	Ile	Arg
140															
AAT	AAT	TTA	GTG	GAT	CTA	TAC	AAT	AAT	GCT	AGT	ACT	TTA	ATA	ACT	AAA
Asn	Asn	Leu	Val	Asp	Leu	Tyr	Asn	Asn	Ala	Ser	Ser	Leu	Ile	Thr	Lys
155															
ACA	CTA	GAT	CCA	CTA	AAT	GGG	GGA	ATG	CTT	TTA	GAT	TCT	AAT	GAG	ATT
Thr	Leu	Asp	Pro	Leu	Asn	Gly	Gly	Met	Leu	Leu	Asp	Ser	Asn	Glu	Ile
175															
ACT	ACA	GTT	AAT	CGG	AAT	ATT	AAT	AAT	ACG	TTA	TCA	ACT	ATT	AAT	GAA
Thr	Thr	Val	Asn	Arg	Asn	Ile	Asn	Asn	Thr	Leu	Ser	Thr	Ile	Asn	Glu
190															
CAA	AAG	ACT	AAT	GCT	GAT	GCA	TTA	TCT	AAT	AGT	TTT	ATT	AAA	AAA	GTG
Gln	Lys	Thr	Asn	Ala	Asp	Ala	Leu	Ser	Asn	Ser	Phe	Ile	Lys	Lys	Val
205															
ATT	CAA	AAT	AAT	GAA	CAA	AGT	TTT	GTA	GGG	ACT	TTT	ACA	AAC	GCT	AAT
Ile	Gln	Asn	Asn	Glu	Gln	Ser	Phe	Val	Gly	Thr	Phe	Thr	Asn	Ala	Asn
220															
GTT	CAA	CCT	TCA	AAC	TAC	AGT	TTT	GTT	GCT	TTT	AGT	GCT	GAT	GTA	ACA
Val	Gln	Pro	Ser	Asn	Tyr	Ser	Phe	Val	Ala	Phe	Ser	Ala	Asp	Val	Thr
235															
CCC	GTC	AAT	TAT	AAA	TAT	GCA	AGA	AGG	ACC	GTT	TGG	AAT	GCT	GAT	GAA
Pro	Val	Asn	Tyr	Lys	Tyr	Ala	Arg	Arg	Thr	Val	Trp	Asn	Gly	Asp	Glu
255															
CCT	TCA	AGT	AGA	ATT	CTT	GCA	AAC	ACG	AAT	AGT	ATC	ACA	GAT	GTT	TCT
Pro	Ser	Ser	Arg	Ile	Leu	Ala	Asn	Thr	Asn	Ser	Ile	Thr	Asp	Val	Ser
270															
TGG	ATT	TAT	AGT	TTA	GCT	GGA	ACA	AAC	ACG	AAG	TAC	CAA	TTT	AGT	TTT

Trp Ile Tyr Ser Leu Ala Gly Thr Asn Thr Lys Tyr Gln Phe Ser Phe			
285	290	295	
AGC AAC TAT GGT CCA TCA ACT GGT TAT TTA TAT TTC CCT TAT AAG TTG			1143
Ser Asn Tyr Gly Pro Ser Thr Gly Tyr Leu Tyr Phe Pro Tyr Lys Leu			
300	305	310	
GTT AAA GCA GCT GAT GCT AAT AAC GTT GGA TTA CAA TAC AAA TTA AAT			1191
Val Lys Ala Ala Asp Ala Asn Asn Val Gly Leu Gln Tyr Lys Leu Asn			
315	320	325	330
ATG GGA AAT GTT CAA CAA GTT GAG TTT GCC ACT TCA ACT ACT GCA AAT			1239
Asn Gly Asn Val Gln Gln Val Glu Phe Ala Thr Ser Thr Ser Ala Asn			
335	340	345	
AAT ACT ACA GCT AAT CCA ACT CCA GCA GTT GAT GAG ATT AAA GTT GCT			1287
Asn Thr Thr Ala Asn Pro Thr Pro Ala Val Asp Glu Ile Lys Val Ala			
350	355	360	
AAA ATC GTT TTA TCA GGT TTA AGA TTT GGC CAA AAC ACA ATC GAA TTA			1335
Lys Ile Val Leu Ser Gly Leu Arg Phe Gly Gln Asn Thr Ile Glu Leu			
365	370	375	
ACT GTT CCA ACG GGT GAA GGA AAT ATG AAT AAA GTT GCG CCA ATG ATT			1383
Ser Val Pro Thr Gly Glu Gly Asn Met Asn Lys Val Ala Pro Met Ile			
380	385	390	
GCC AAC ATT TAT CTT ACC TCA AAT GAA AAT AAT GCT GAT AAG ATC TAC			1431
Gly Asn Ile Tyr Leu Ser Ser Asn Glu Asn Asn Ala Asp Lys Ile Tyr			
395	400	405	410
AAT GAT ATC TTT GGT AAC ACA ATC AAC CAA CAG AAT AAT GCT ATT TCT			1479
Asn Asp Ile Phe Gly Asn Thr Ile Asn Gln Gln Asn Asn Ala Ile Ser			
415	420	425	
GTA ATG GTT AAT ATG GTT GAG GGA TAT AAT TTA GCT AGT AGT TAT TCT			1527
Val Met Val Asn Met Val Glu Gly Tyr Asn Leu Ala Ser Ser Tyr Ser			
430	435	440	
CCA CCA TAT AAA CCA ATT AAT GTT TCC ACT GGT GCT CAA ACT CAA			1575

Pro Ala Tyr Lys Pro Ile Asn Val Ser Thr Gly Gly Gly Gln Thr Gln			
445	450	455	
CCA TAT TAT GTC ATT GGT TGA TTG GGC GCT AGT GAT CAG AAC CCT AGA			1623
Pro Tyr Tyr Val Ile Gly Trp Leu Gly Ala Ser Asp Gln Asn Pro Arg			
460	465	470	
AAC GCT GTG GGA ACC AAC ATG AAC GTC CAA AGA GTT CCA GCA ACA AAT			1671
Asn Ala Val Gly Thr Asn Met Asn Val Gln Arg Val Pro Ala Thr Asn			
475	480	485	490
AGC AAC CAA CCC GGA TAT GCT AGA TAT GTC TCT TTT TAT GTT AAT GCT			1719
Ser Asn Gln Gly Gly Tyr Ala Arg Tyr Val Ser Phe Tyr Val Asn Ala			
495	500	505	
CCA CAA CCT GCT TCA TAT ATT AGT GGT AAC TAT AAT AGT TTA ACA			1767
Pro Gln Ala Gly Ser Tyr Tyr Ile Ser Gly Asn Tyr Asn Ser Leu Thr			
510	515	520	
GCT AGA GGT CTA GCT GTG TCT ACT GAG AAA ACA TTT ACA ACC AAT GTG			1815
Ala Arg Gly Leu Ala Val Ser Thr Glu Lys Thr Phe Thr Thr Asn Val			
525	530	535	
ATC AAG ATC ACT CAC TTA CAA GTC ATT AAT GCC ACT AAT AGA ATC TTA			1863
Ile Lys Ile Thr His Leu Gln Val Ile Asn Ala Thr Asn Arg Ile Leu			
540	545	550	
ACC TTT GAT ACT AAA ACA AAA AGA GGA ACT GAT AGT AAT AAC GGT AAT			1911
Thr Phe Asp Thr Lys Thr Lys Arg Gly Thr Asp Ser Asn Asn Gly Asn			
555	560	565	570
ATT ACA TTA GAA GCA AAC AAA GAC ACA ATA ACA TTA ACT AAG GGT TGA			1959
Ile Thr Leu Glu Ala Asn Lys Asp Thr Ile Thr Leu Thr Lys Gly Trp			
575	580	585	
AAC AAA CTT TAT GTT TCA GGT AAT AAT AAT GAC AGT GTC GGT ATT GGT			2007
Asn Lys Leu Tyr Val Ser Gly Asn Asn Asn Asp Ser Val Gly Ile Gly			
590	595	600	
AAT CTT ACT TTT ACA TTA ATG CCA CCA CAA ACT AAT TCA TAATTAAGAT			2056

Asn Leu Thr Phe Thr Leu Met Pro Pro Gln Thr Asn Ser

605

610

615

ATATTAAACA TACCCATTAA GATAATCTAA ATGGCTATCT	TTTTTATTGA AAATGGCGCA	2116
TGATGAAATC AAAGTTAAGT TCACTAGTGC TTTGATAAAT TAGATCAGCT	TTAGAANNAT	2176
CTTCACTACT GCCATGGGTA ATGACAACAG CTTTCATTAA GNCTGCTTCG ATCGCTTTCA		2236
ATCCTGAGAT CGCATCTTCA AACCCAATAN CTINATCATT GCTGATATCT AAGTCITCTN		2296
CAGCTTTAAG ATAGATATCA GCTNCTGGTT TACCTTGGTT AATCTCACTT		2346

(2) 配列番号 2 8 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ : 17
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 D N A

(xi) 配列の表示 : 配列番号 2 8

GTTTTCCCAGTCACGAC

17

(2) 配列番号 2 9 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ : 27
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー : 直鎖状
- (E) 配列の種類 : 他の核酸 合成 D N A

(xi) 配列の表示 : 配列番号 2 9

AACCAACCAACCCGATCGCTAGTCT

27

(2) 配列番号 3 0 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 20
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 3 0

TGATTGGCGCTAGCGATCA

20

(2) 配列番号 3 1 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 23
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 3 1

TCCCAACCTTGTTCGAAATACAA

23

(2) 配列番号 3 2 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 19

- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 3 2

TGAAACAAAGCTTATGTTT

19

(2) 配列番号 3 3 についての情報

- (i) 配列の特性
- (A) 配列の長さ: 17
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 3 3

CAGTATCGACAAAGGAC

17

(2) 配列番号 3 4 についての情報

- (i) 配列の特性
- (A) 配列の長さ: 17
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 3 4

CAGGAAACAGCTATGAC

17

(2) 配列番号 3 5 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 20
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 3 5

GTTCTTCCTGGCAAACTTTA

20

(2) 配列番号 3 6 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 20
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA

(xi) 配列の表示: 配列番号 3 6

AAGAAGGACCGTTGGAATG

20

(2) 配列番号 3 7 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 17

- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 3 7

GTTTTCCCGAGTCACGAC

17

(2) 配列番号 3 8 についての情報

- (i) 配列の特性
- (A) 配列の長さ: 27
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 3 8

CAAAGTACCTAAATATCGAATTACCT

27

(2) 配列番号 3 9 についての情報

- (i) 配列の特性
- (A) 配列の長さ: 23
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 3 9

ATAGCTTAAGTGGAACAAACACG

23

(2) 配列番号 4 0 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 20
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 4 0

GGAACCAGATCTTGTTC

20

(2) 配列番号 4 1 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 21
- (B) 配列の型: 核酸
- (C) 鎖の数: 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 4 1

GGTCTAGAACAAAGGGATTGGACA

21

(2) 配列番号 4 2 についての情報

(i) 配列の特性

- (A) 配列の長さ: 20

- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 4 2

CTACCTACCATGGTGATGAT

20

(2) 配列番号 4 3 についての情報

- (i) 配列の特性
- (A) 配列の長さ: 27
- (B) 配列の型 : 核酸
- (C) 鎖の数 : 一本鎖
- (D) トポロジー: 直鎖状
- (E) 配列の種類: 他の核酸 合成DNA
- (xi) 配列の表示: 配列番号 4 3

GATGGTACCACTACTATTCATGGACA

27

請求の範囲

1. マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAを組み込んだ組み換えアビポックスウイルス。
2. マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAの末端側に、更に鳥類に感染するウイルスのタイプII外膜タンパク質のシグナル膜アンカーをコードするDNAを組み込んだ請求項1記載の組み換えアビポックスウイルス。
3. シグナル膜アンカーをコードするDNAがニューカッスル病ウイルスのヘマグルチニン・ノイラミニダーゼのシグナル膜アンカーをコードするDNAである請求項2記載の組み換えアビポックスウイルス。
4. 組み込んだ抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAがマイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清に反応しうる実質的に純粹な抗原性を示すポリペプチドをコードするDNAであって、その塩基配列が配列1、配列14、配列15、配列16または配列27に示されたものである請求項1、2または3に記載の組み換えアビポックスウイルス。
5. DNAが配列14または配列15に記載の塩基配列またはそれと実質的に同一の機能を持つ塩基配列を有するものである請求項1または2記載の組み換えアビ

ポックスウイルス。

6. 請求項 1, 2, 3, 4 または 5 記載の組み換えアビポックスウイルスを有効成分とした抗家禽マイコプラズマ・ガリセプティカム感染症用組み換え生ワクチン。

7. マイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清に反応しうる実質的に純粋な抗原タンパク質であって、第 1 図に示される制限酵素切断点地図を有するマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の遺伝子がコードする抗原タンパク質、またはそれと同等の免疫性を示す限りにおいて修飾されていてもよい抗原タンパク質。

8. 請求項 7 記載の抗原タンパク質をコードする遺伝子。

9. マイコプラズマ免疫血清またはマイコプラズマ感染血清に反応しうる実質的に純粋な抗原タンパク質であって、第 7 図に示される制限酵素切断点地図を有するマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の遺伝子がコードする抗原タンパク質、またはそれと同等の免疫性を示す限りにおいて修飾されていてもよい抗原タンパク質。

10. 請求項 9 記載の抗原タンパク質をコードする DNA。

11. マイコプラズマ・ガリセプティカム免疫血清またはマイコプラズマ・ガリセプティカム感染血清に反応しうる実質的に純粋な抗原タンパク質であって、第 8 図に示される制限酵素切断点地図を有するマイコプラズマ

・ガリセプティカム由来の遺伝子がコードする抗原タンパク質、またはそれと同等の免疫性を示す限りにおいて修飾されていてもよい抗原タンパク質。

12. 請求項11記載の抗原タンパク質をコードする遺伝子。

13. マイコプラズマ免疫血清またはマイコプラズマ感染血清に反応しうる実質的に純粹な抗原タンパク質であって、第10図に示される制限酵素切断点地図を有するマイコプラズマ・ガリセプティカム由来の遺伝子がコードする抗原タンパク質、またはそれと同等の免疫性を示す限りにおいて修飾されていてもよい抗原タンパク質。

14. 請求項13記載の抗原タンパク質をコードするDNA。

15. マイコプラズマ・ガリセプティカムの抗原性を示すポリペプチドの5' - 末端側に鳥類に感染するウイルスのタイプII外膜タンパク質のシグナル膜アンカーが連結していることを特徴とする融合タンパク質。

16. シグナル膜アンカーがニューカッスル病ウイルスのヘマグルチニン・ノイラミニダーゼのシグナル膜アンカーである請求項11記載の融合タンパク質。

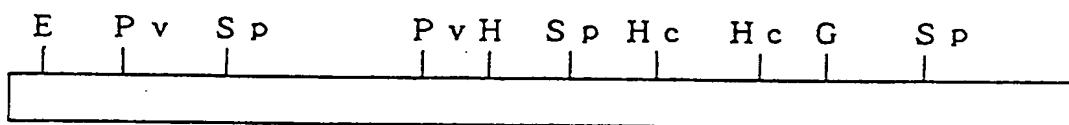
17. 請求項15記載の融合タンパク質をコードするハイブリッドDNA。

18. 請求項7, 9, 11, 13, 15または16に記載のタンパク質を有効成分とするコンポネントワクチン。

1 / 18

FIG. I

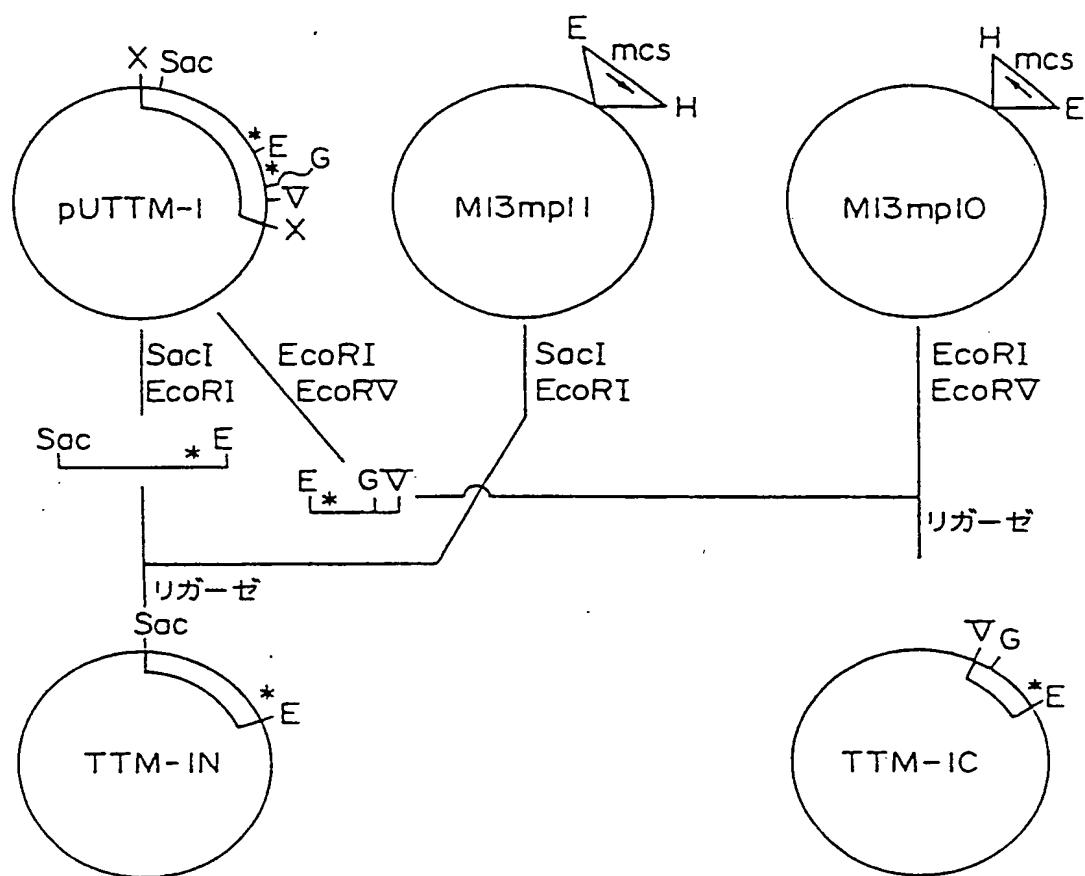
(TM-81 の制限酵素切断点地図)



E : E c o R I 、 P v : P v u I I 、 S p : S p a I 、 H : H i n d I I I
H c : H i n c I I 、 G : B g I I

2/18

FIG. 2



E : EcoRI

▽ : EcoRV

G : Bgl II

Sac : SacI

X : XbaI

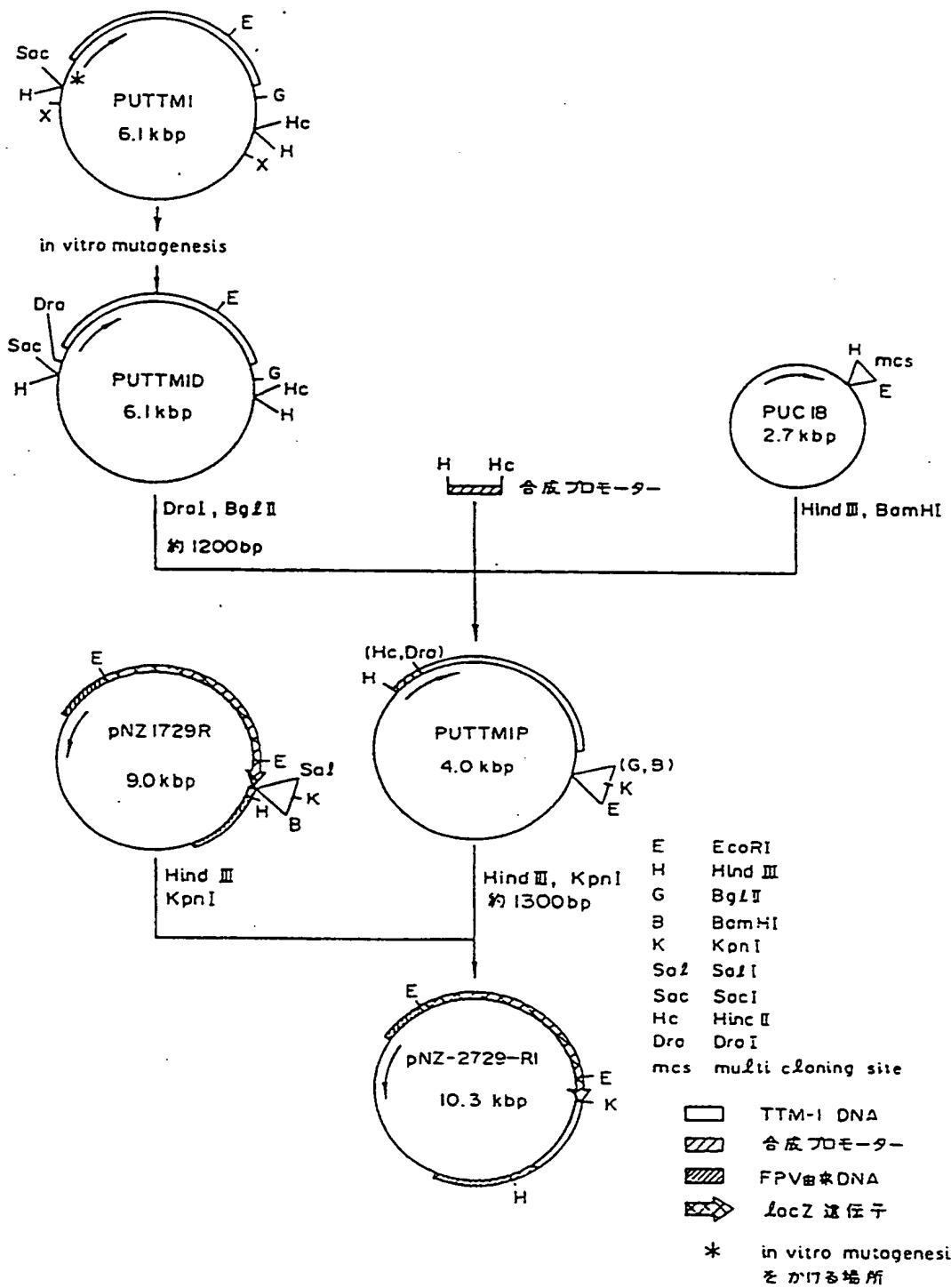
Ss : SspI

Sp : SpeI

* 変異をかけるヌクレオチドの位置

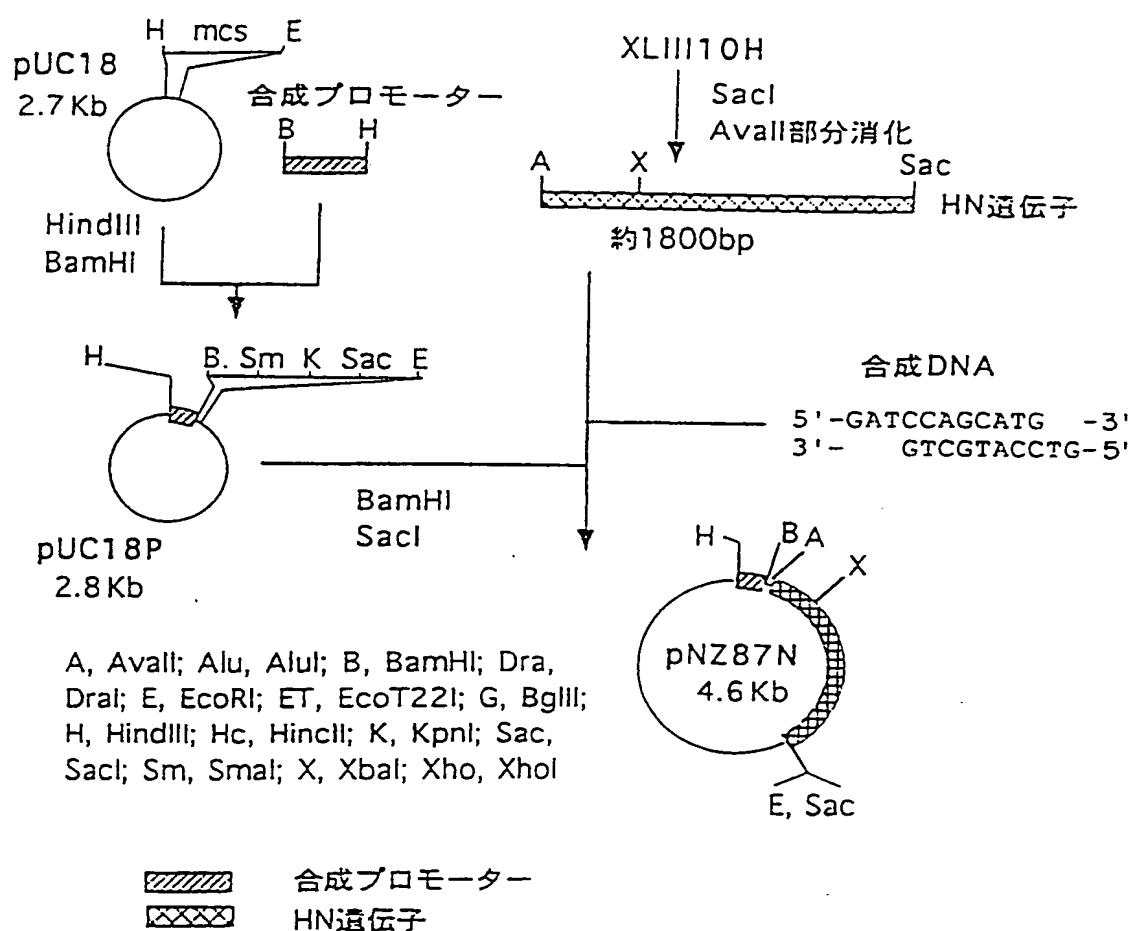
3 / 18

FIG. 3



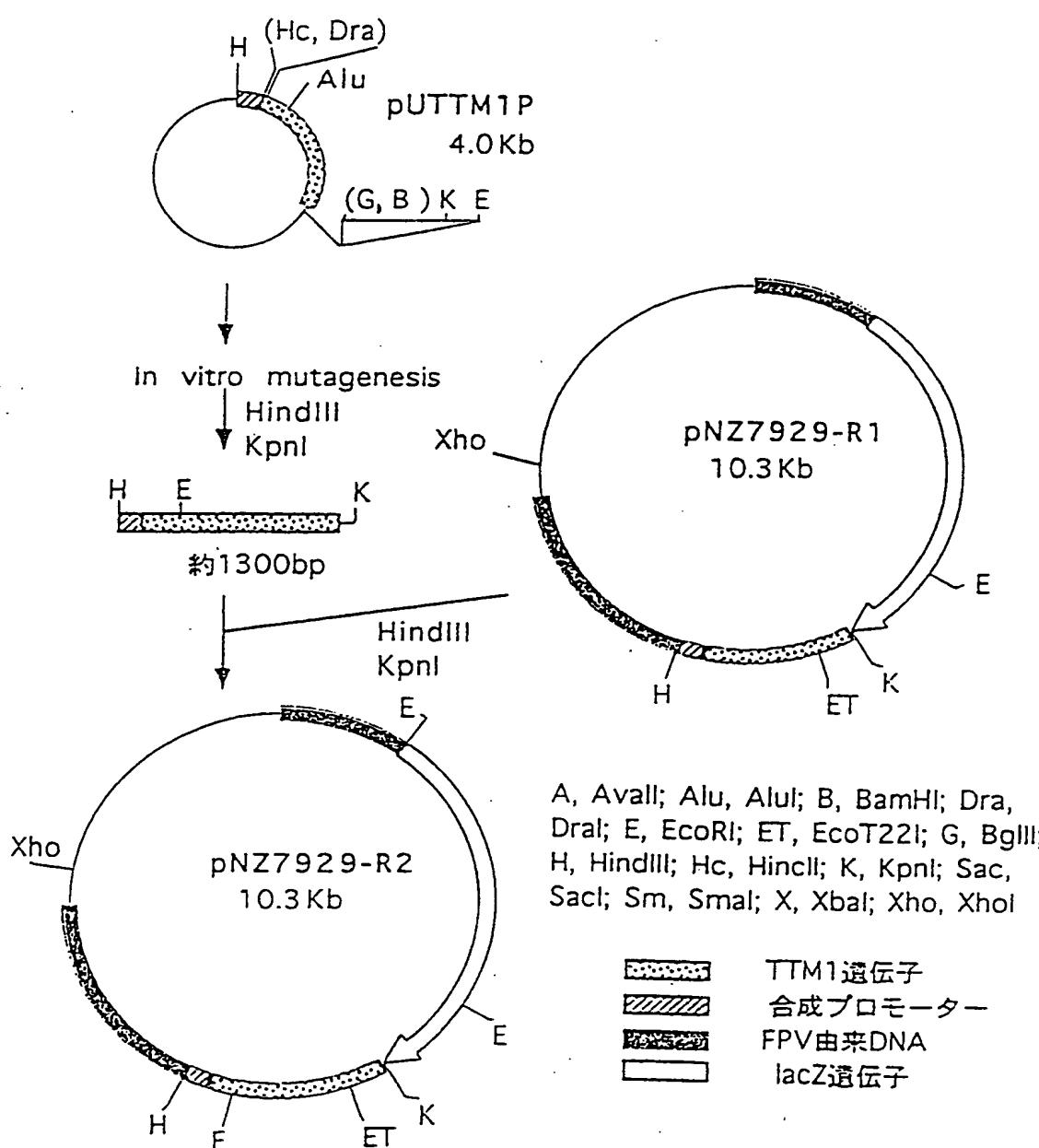
4 / 18

FIG. 4



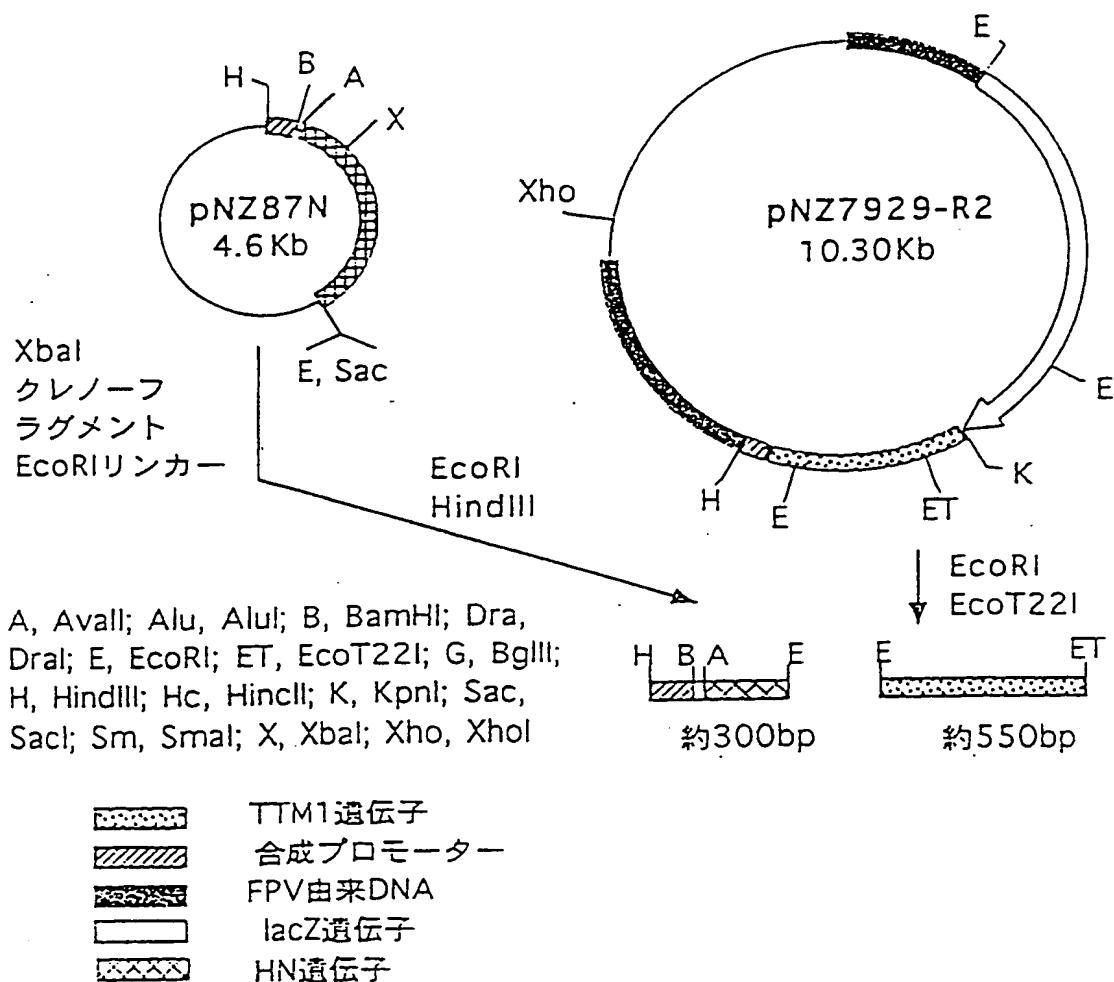
5 / 18

FIG. 5



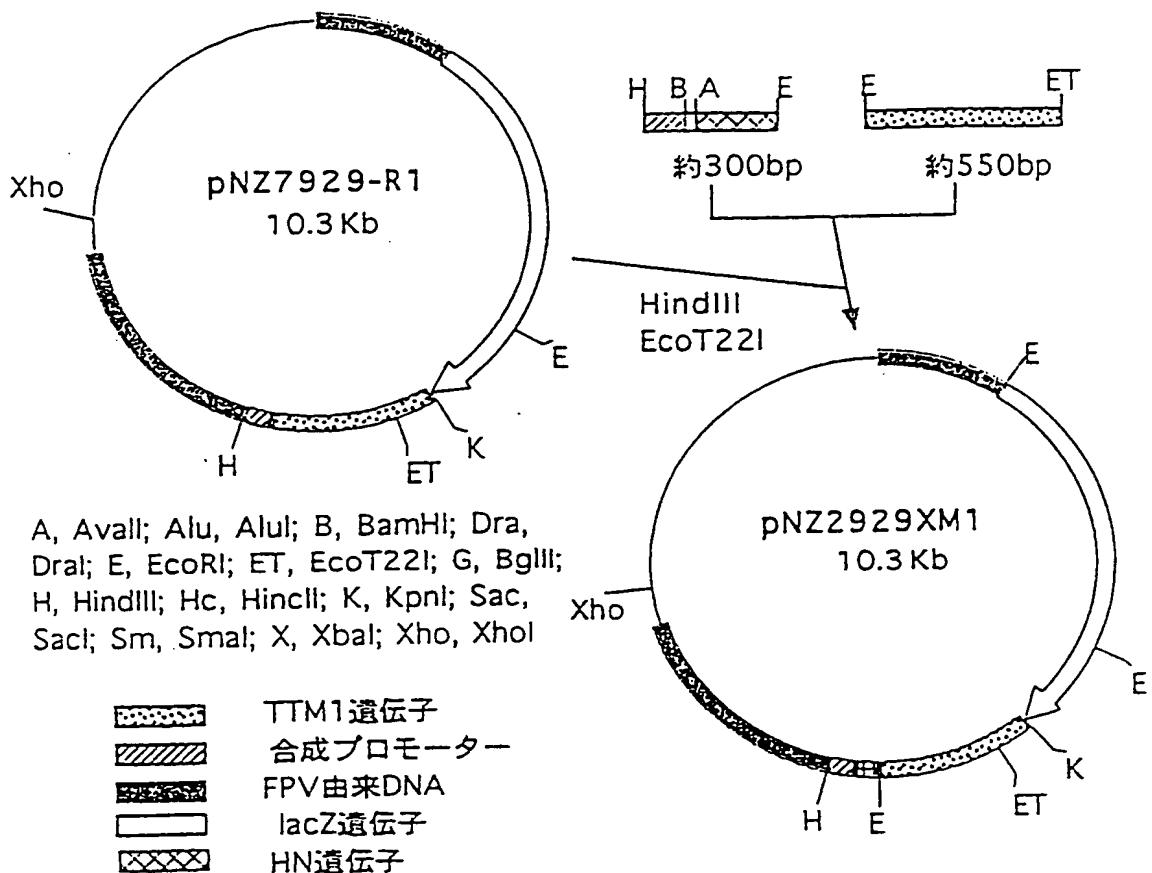
6 / 18

FIG. 6(A)



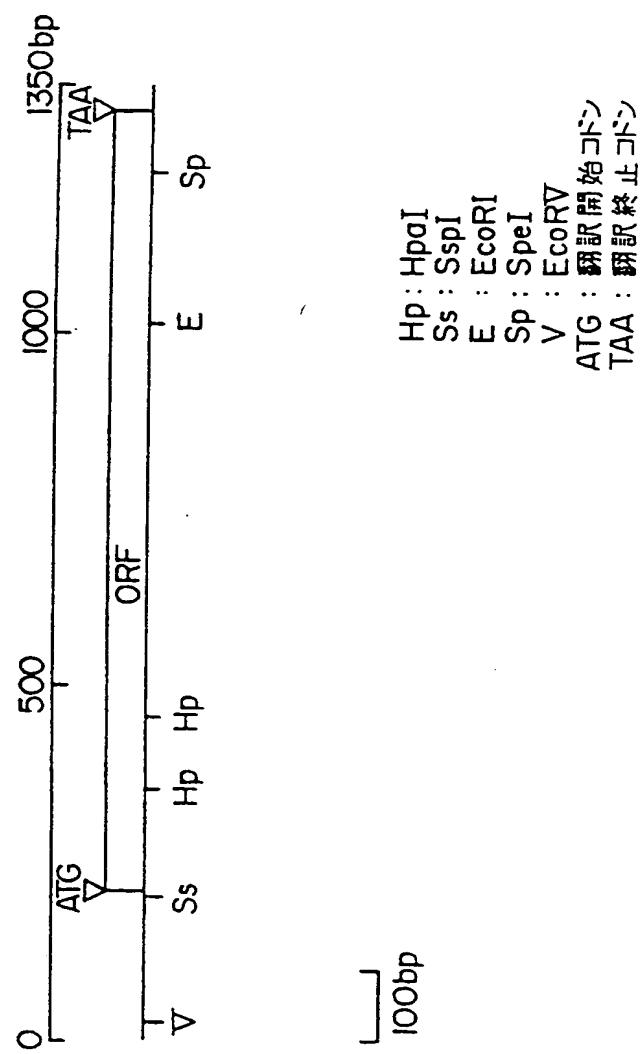
7 / 18

FIG. 6 (B)



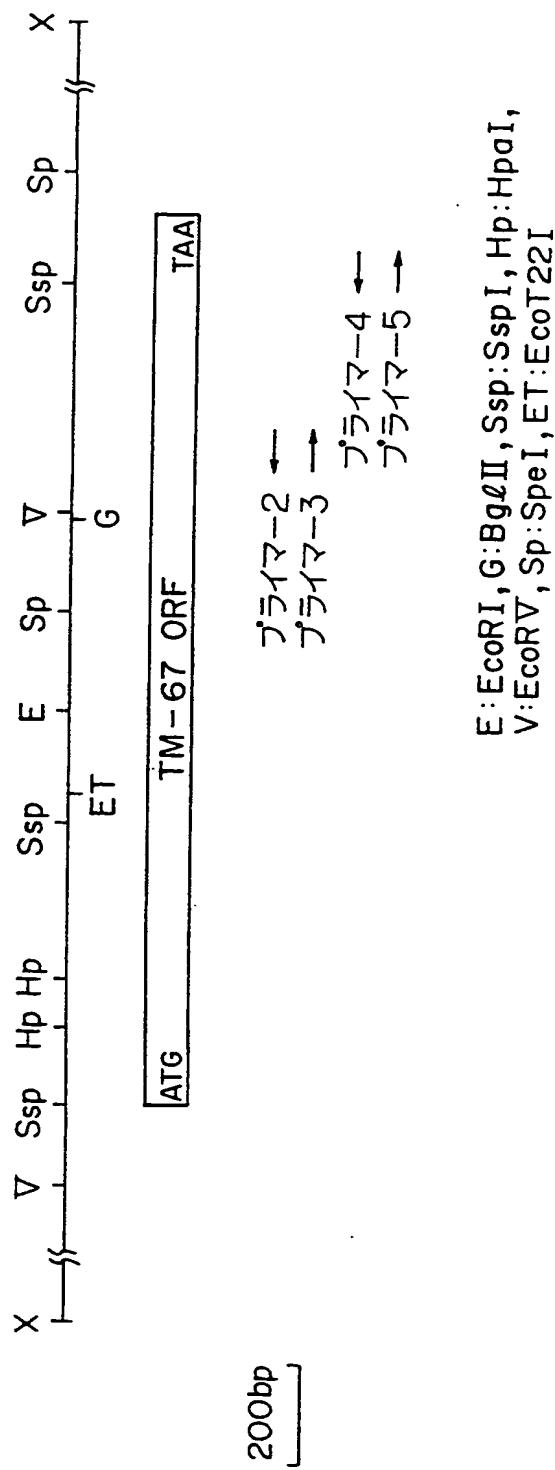
8 / 18

FIG. 7



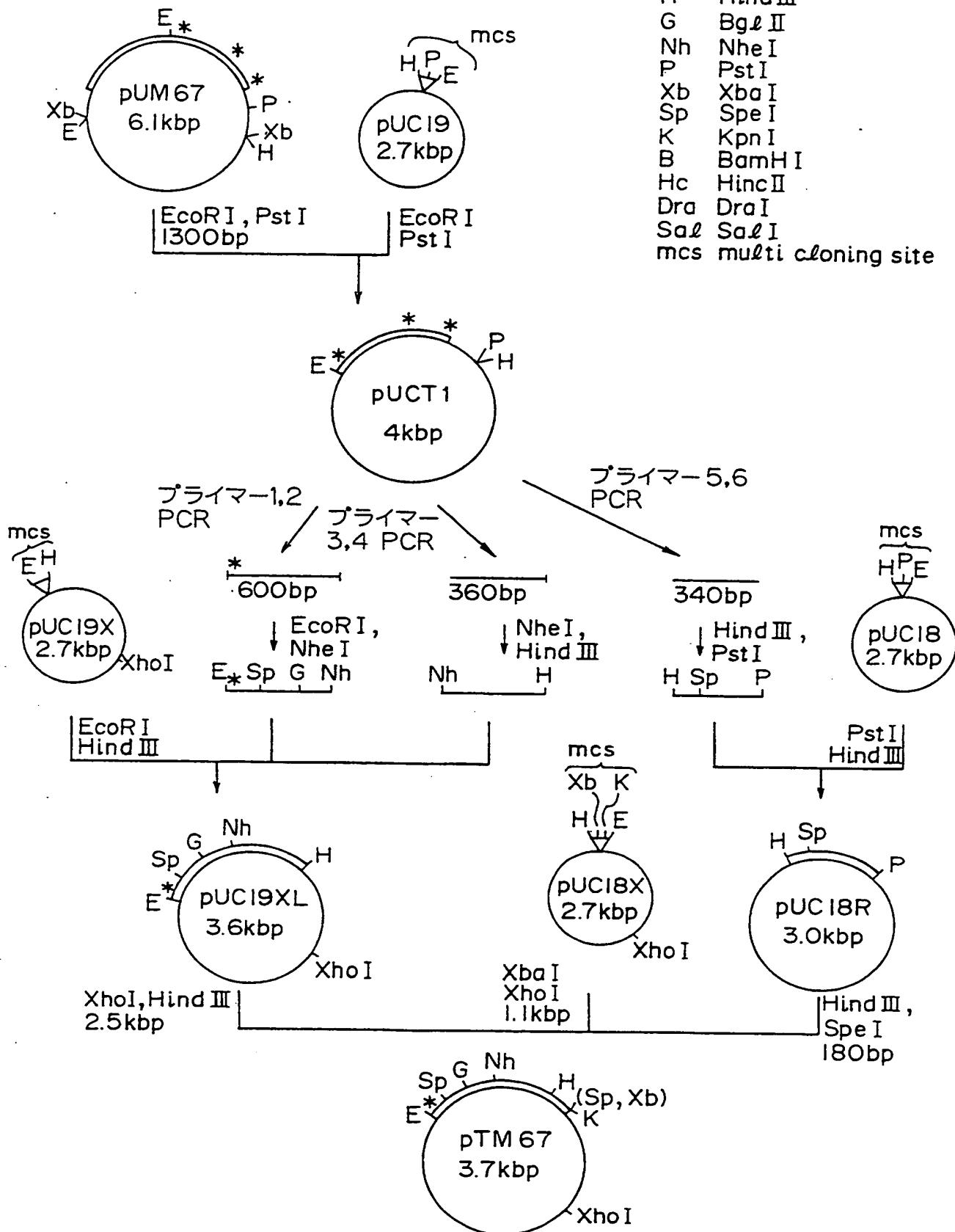
८५

TM-67 ORFの制限酵素切断点地図と合成プライマーのORF上の位置



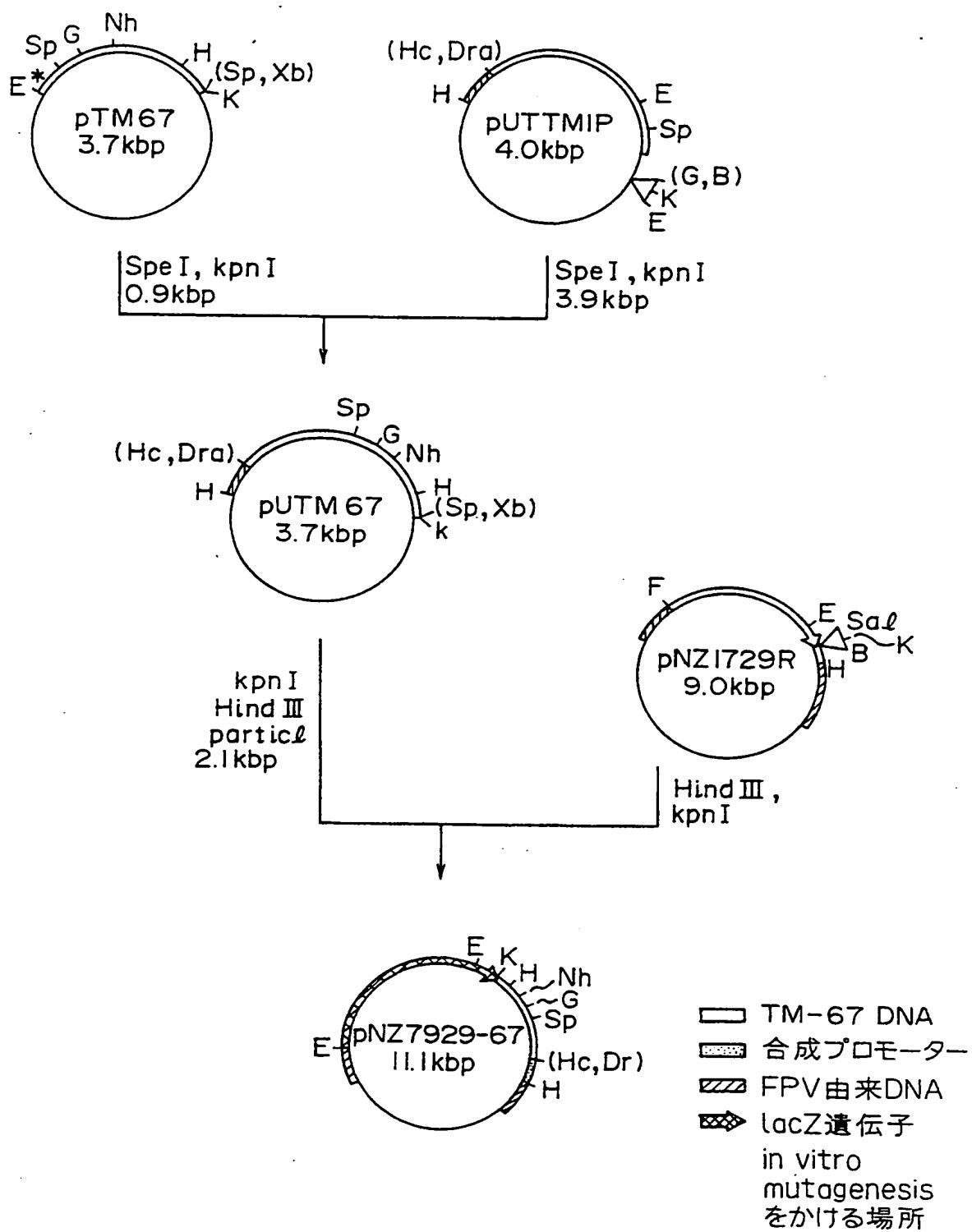
10 / 18

FIG. 9(A)



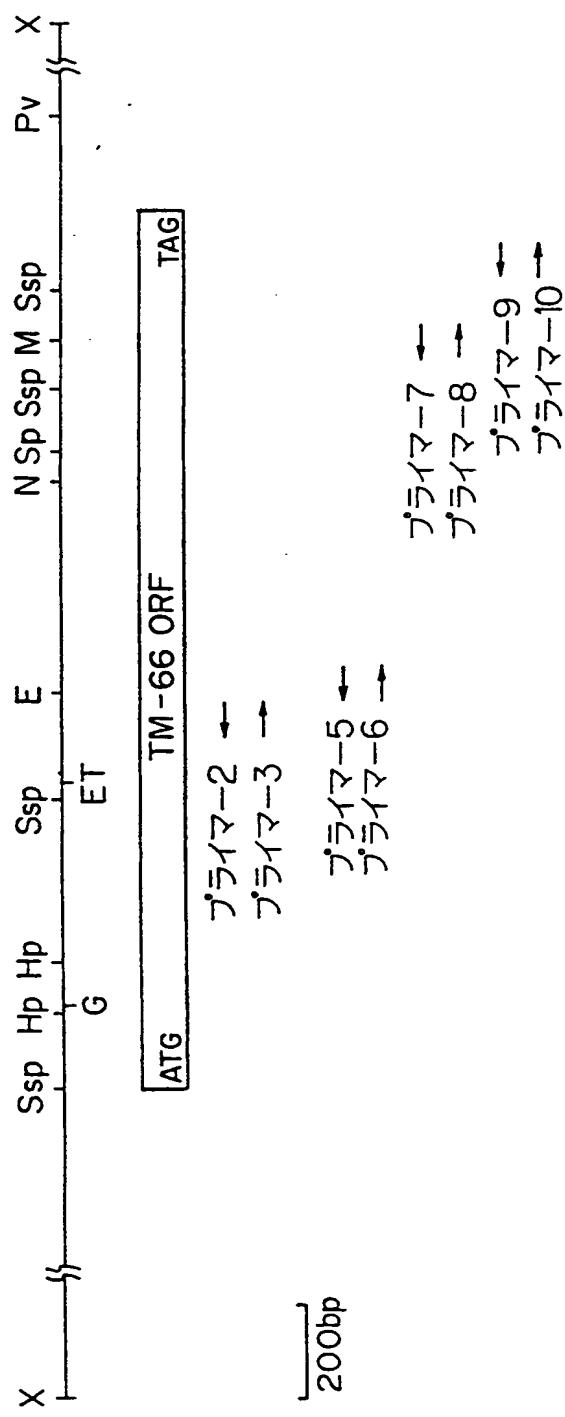
11/18

FIG. 9(B)



12/18

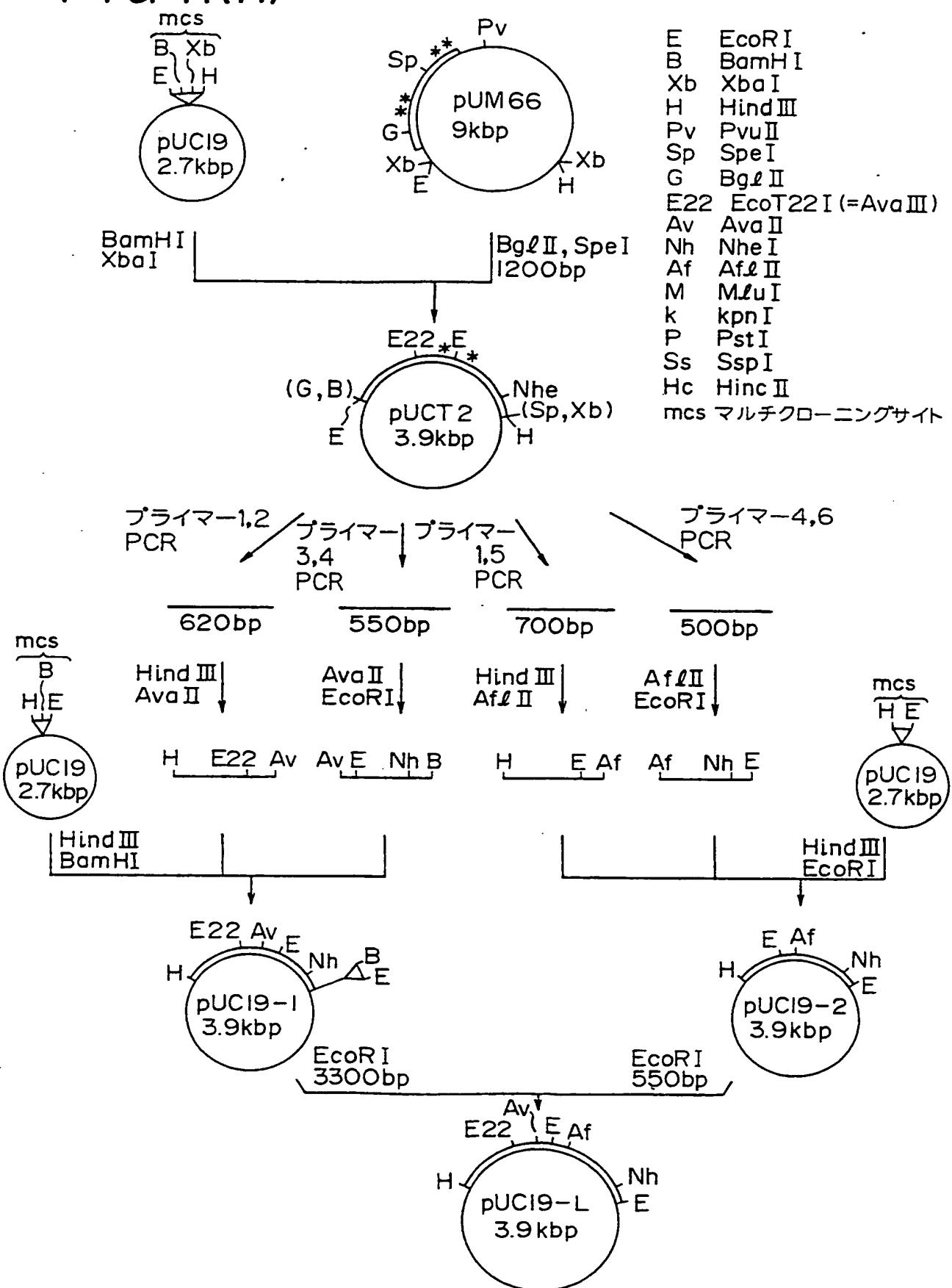
FIG. 10 TM-66 ORFの制限酵素切断点地図と合成プライマーのORF上の位置



E: EcoRI, G: BgII, Ssp: SspI, Hp: HpI, X: XbaI
 N: NheI, Sp: SpI, ET: EcoT22I, M: MspI, Pv: PvuII

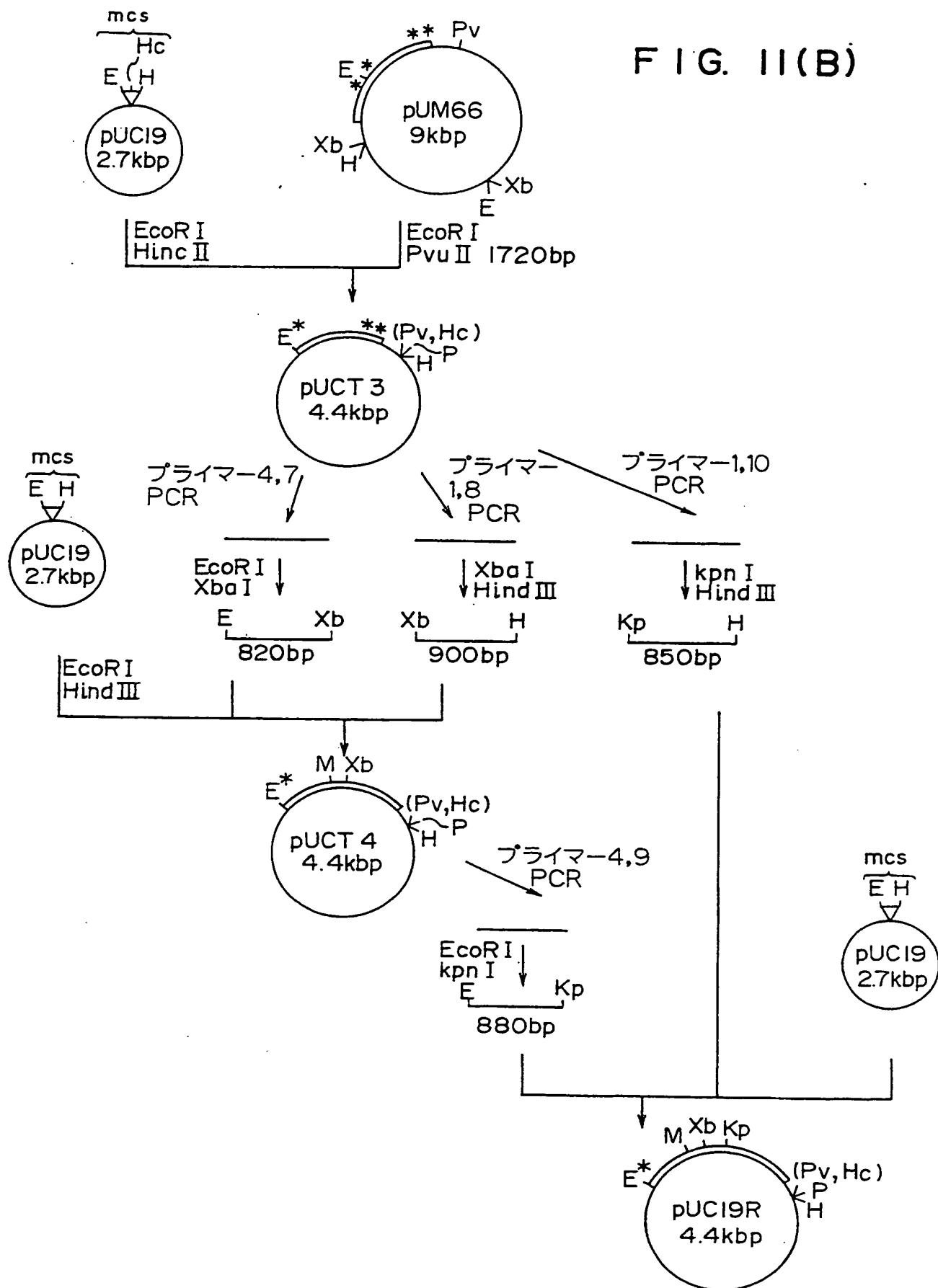
FIG. II(A)

13 / 18



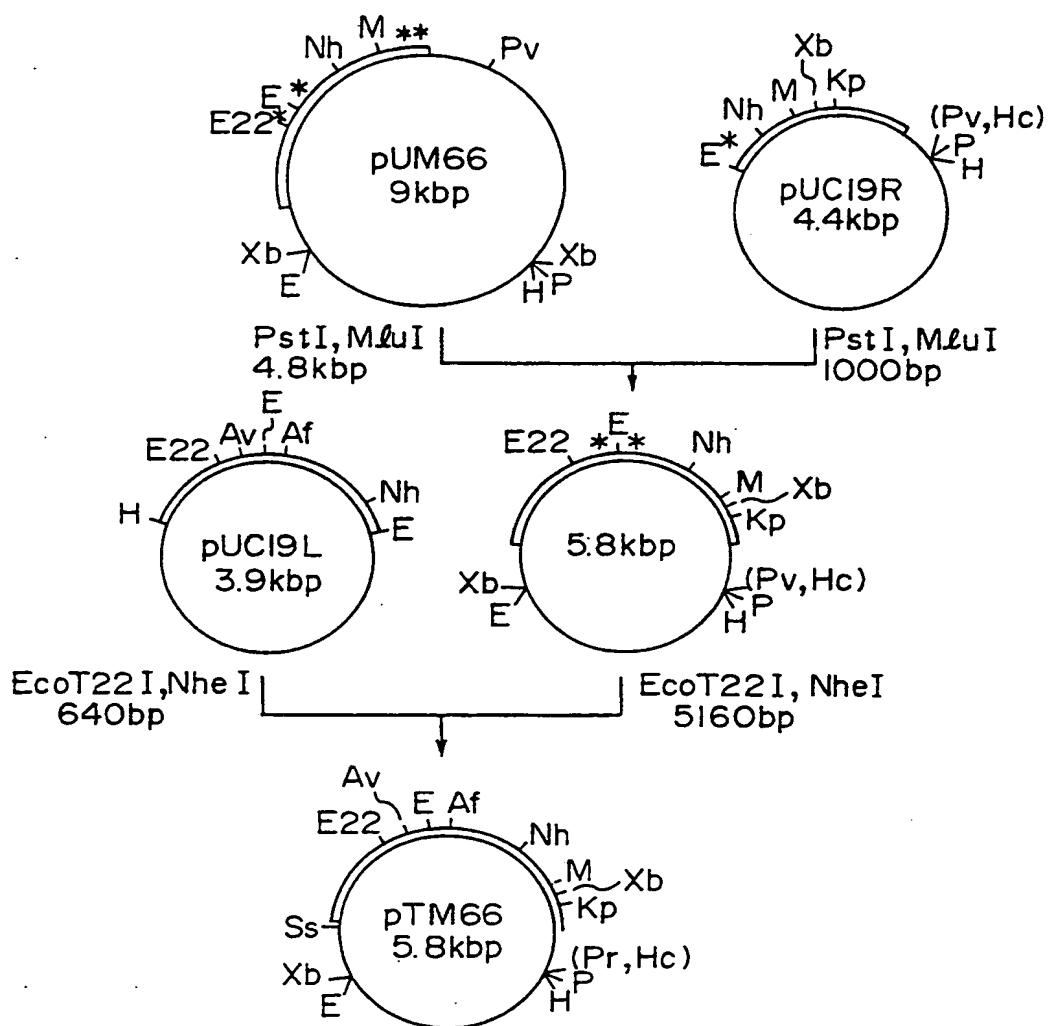
14 / 18

FIG. II(B)



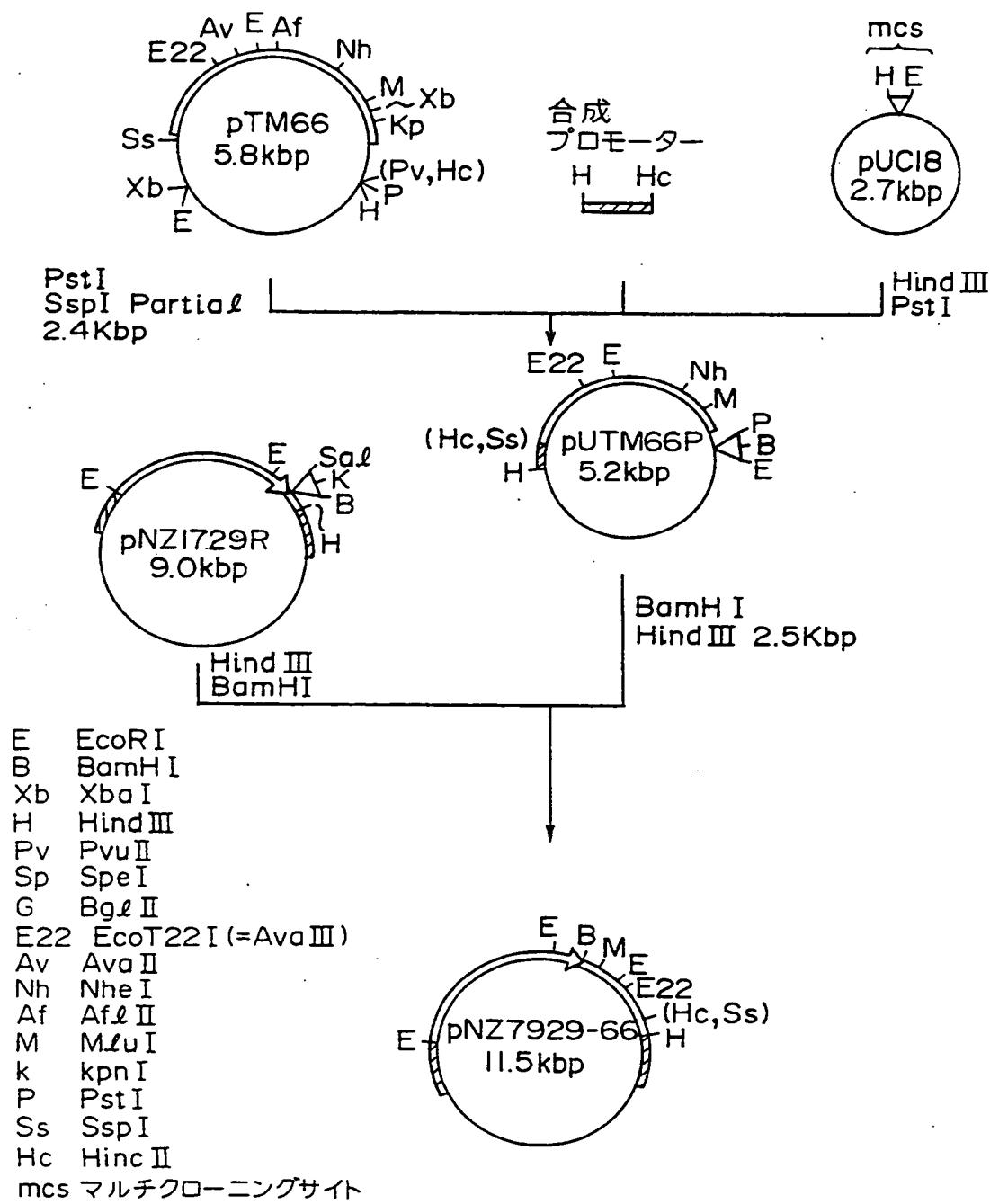
15 / 18

FIG. II (C)



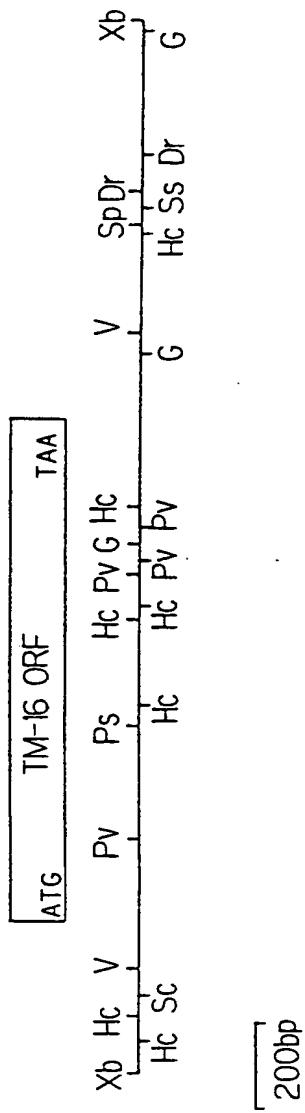
16 / 18

FIG. 12



17 / 18

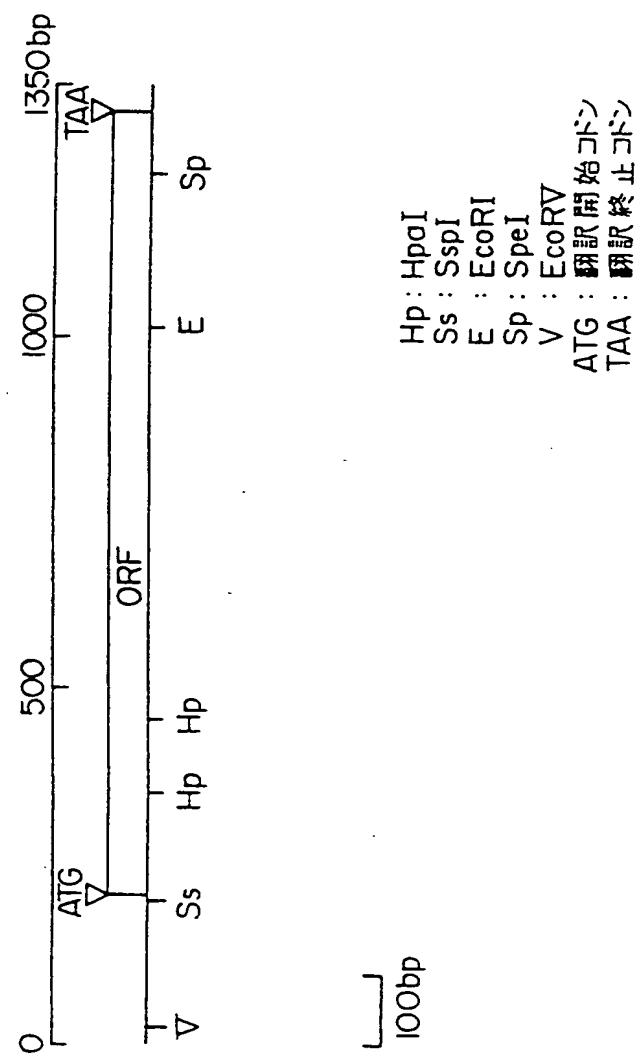
F 1 G. 13



Hinc II, Pvu II, Pst I, G, Bgl II

18 / 18

FIG. 14



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP94/00541

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl⁵ C12N7/01, C12N15/31, C12N15/62, C12P21/02, C07K7/10,
A61K39/02// (C12P21/02, C12R1:92)
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl⁵ C12N7/01, C12N15/31, C12N15/62, C12P21/02, C07K7/10,
A61K39/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CAS ONLINE, BIOSIS PRE VIEWS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP, A, 1-168279 (Nippon Zeon Co., Ltd.), July 3, 1989 (03. 07. 89) & EP, A, 284416 & AU, A, 8813766	1-7, 9, 11, 13, 15-16, 18
Y	JP, A, 2-111795 (Nippon Zeon Co., Ltd., Shionogi & Co., Ltd.), April 24, 1990 (24. 04. 90), (Family: none)	1-3, 6-18
Y	Molecular and Cellular Biology, volumne 10, No. 2, (1990), Wilson C. et al.: "Abenant membrane insertion of a cytoplasmic tail deletion mutant of the hemagglutinin- neuraminidase glycoprotein of newcastle disease virus", see P. 449-457	2-7, 9, 11, 13, 15-18
Y	WO, A, 9324646 (Nippon Zeon Co., Ltd., Shionogi & Co., Ltd.), December 9, 1993 (09. 12. 93) & AU, A, 9340903	1-6, 15, 17-18

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
June 20, 1994 (20. 06. 94)	July 12, 1994 (12. 07. 94)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類(国際特許分類(IPC))

Int. CL⁸ C12N7/01, C12N15/31, C12N15/62,
 C12P21/02, C07K7/10, A61K39/02//
 (C12P21/02, C12B1:92)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料(国際特許分類(IPC))

Int. CL⁸ C12N7/01, C12N15/31, C12N15/62,
 C12P21/02, C07K7/10, A61K39/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース(データベースの名称、調査に使用した用語)

CAS ONLINE, BIOSIS PRE VIEWS

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	JP, A, 1-168279 (日本ゼオン株式会社), 3. 7月. 1989 (03. 07. 89) & EP, A, 284416 & AU, A, 8813766	1-7, 9, 11, 13, 15-16, 18
Y	JP, A, 2-111795 (日本ゼオン株式会社, 塩野義製薬 株式会社), 24. 4月. 1990 (24. 04. 90) (ファミリーなし)	1-3, 6-18

C欄の続きにも文献が列挙されている。

パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
- 「E」先行文献ではあるが、国際出願日以後に公表されたもの
- 「I」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献(理由を付す)
- 「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
- 「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
- 「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
- 「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
- 「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

20. 06. 94

国際調査報告の発送日

12.07.94

名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
郵便番号 100
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

特許庁審査官(権限のある職員)

齊藤 真由美

4 B 8 9 3 1

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C(続き) 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Molecular and Cellular Biology, volume 10, No 2, (1990), Wilson C. et al : "Aberrant membrane insertion of a cytoplasmic tail deletion mutant of the hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein of newcastle disease virus", see p.449-457	2-7, 9, 11, 13, 15-18
Y	WO, A, 9324646 (日本ゼオン株式会社, 塩野義製薬株式会社), 9. 12月. 1993 (09. 12. 93) & AU, A, 9340903	1-6, 15, 17-18